



Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2



Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per:
Invenzione Industriale N. MI2003 A 001156 del 09.06.2003

REC'D 02 AUG 2004

WIPO

PCT

Si dichiara che l'unità copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopra specificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

oma, li..... 28 GIU. 2004

IL FUNZIONARIO

Giampietro Carlotta

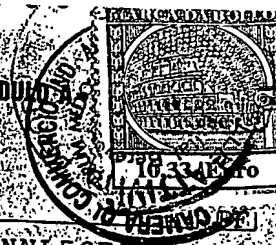
Giampietro Carlotta

AL MINISTERO DELLE ATTIVITA' PRODUTTIVE

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITA' AL PUBBLICO

MODULO 7A



A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione ANTONELLO PIETRANGELOResidenza MODENA

2) Denominazione

Residenza

codice PTRN156E03H425K

codice

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome nome Dr. Gemma Gervasi ed altri

cod. fiscale

denominazione studio di appartenenza Notarbartolo & Gervasi S.p.A.via C.so di Porta Vittorian. 9città Milanocap 20122(prov) MI

C. DOMICILIO ELETTIVO destinataria

via

n. 1

città

cap

(prov)

D. TITOLO

classe proposta (sez/cl/scd) G12Qgruppo/sottogruppo 11/68Mutazioni nel gene SLC40A1 associate ad alterata omeostasi del ferro

ANTICIPATA ACCESSIBILITA' AL PUBBLICO:

SI ☐ NO ☒

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

SE ISTANZA: DATA

N° PROTOCOLLO

1) PIETRANGELO Antonello

2)

3)

4)

cognome nome

F. PRIORITA'

nazione o organizzazione

tipo di priorit 

numero di domanda

data di deposito

allegato
S/R1) nessuna

2)

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA CULTURE DI MICRORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

nessuna

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1) 1 PROV n. pag. 74Doc. 2) 1 PROV n. tav. 03Doc. 3) 0 RISDoc. 4) 0 RISDoc. 5) 0 RISDoc. 6) 0 RISDoc. 7) 0

riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)

disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)

lettera d'incarico, procura o riferimento procura generale

designazione inventore

documenti di priorit  con traduzione in italiano

autorizzazione o atto di cessione

nominativo completo del richiedente

8) attestati di versamento, totale Euro Quattrocentosettantadue/56COMPILATO IL 09/06/2003

FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE(I)

Gemma Gervasi

obbligatorio

CONTINUA SI/NO noDEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO SICAMERA DI COMMERCIO IND. ART. E AGR. DI MILANO MILANO

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA MI2003A 001156

Reg. A.

15 1/6L'anno DUEMILATREil giorno NOVEdel mese di GIUGNO(I) richiedente(i) sopraindicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n. 09 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraindicato.I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE IL RAPPRESENTANTE E' INFORMATO DEL CONTENUTO DELLA CIRCOLARE N. 423 DEL 01.03.2001, EFFETTUA IL DEPOSITO CON RISERVA DI LETTERA D'INCARICO.

IL DEPOSITANTE

Guille Ambe

L'UFFICIALE ROGANTE

M. CORTONESI

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE DESCRIZIONE E RIVENDICAZIONE

NUMERO DOMANDA

MI 2003/001156

REG. A

DATA DI DEPOSITO

09/06/2003

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCIO

21/03/2004

TITOLO

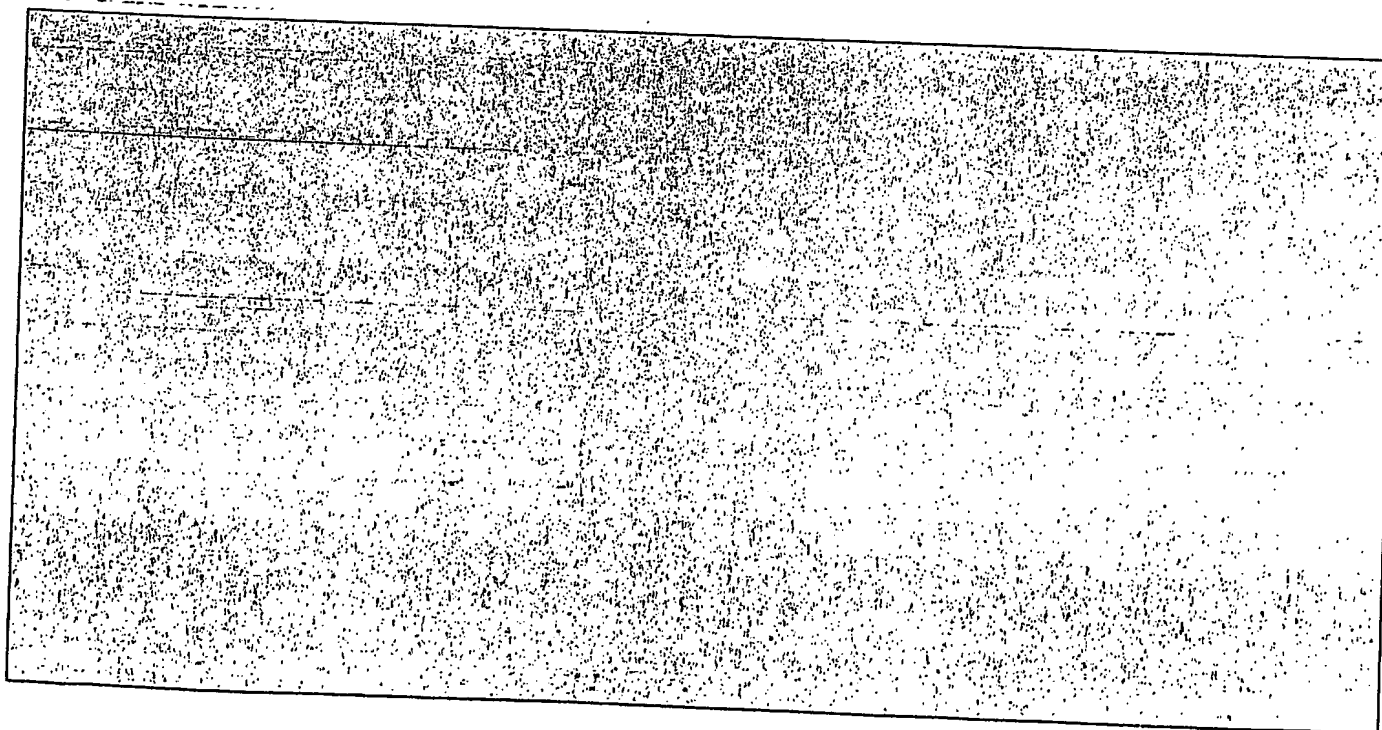
Mutazioni nel gene SLC40A1 associate ad alterata omeostasi del ferro

L. RIASSUNTO

La presente invenzione riguarda mutazioni nel gene SLC40A1 codificante per la ferroportina 1, associate ad alterata omeostasi del ferro o ad emocromatosi ereditaria non dipendente dal gene HFE e a metodi per la diagnosi di tali patologie ereditarie basati sull'identificazione di tali mutazioni.



M. DISEGNO



3946PTIT

Notarbartolo & Gervasi S.p.A.

Descrizione dell'invenzione industriale dal titolo :

"Mutazioni nel gene SLC40A1 associate ad alterata omeostasi del ferro"

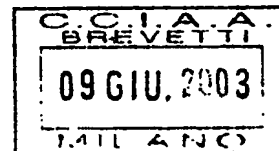
a nome di: PIETRANGELO ANTONELLO

MI 2003 A 0 0 1 1 5 6

residente in : MODENA

Inventore designato : PIETRANGELO Antonello

* * * * *



CAMPO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione riguarda nuove mutazioni nel gene codificante la Ferroportina 1 associate ad una nuova forma di malattia ereditaria da accumulo di ferro e l'identificazione di tali mutazioni quale metodo diagnostico per le emocromatosi ereditarie.

STATO DELL'ARTE

L'emocromatosi è una patologia ereditaria caratterizzata da un accumulo eccessivo di ferro nell'organismo, il quale porta con il tempo a lesioni a livello di diversi organi e tessuti, in particolare di fegato, miocardio, pancreas, rene, milza, gonadi e cute. L'emocromatosi idiopatica è la malattia ereditaria più diffusa nella popolazione occidentale (incidenza 1:300) ed è caratterizzata da una trasmissione recessiva. Questo tipo di emocromatosi è stata dapprima associata a mutazioni del gene HFE (Hereditary hemochromatosis descritta in Feder et al. Nat. Genet. 1996, 13:399-408). Studi più recenti hanno dapprima ipotizzato e quindi dimostrato che nelle popolazione sud-europee in particolare, altri geni oltre al HFE potessero essere responsabili dell'emocromatosi idiopatica (Piperno e altri, Gastroenterology 1998, 114: 996-1002 e Borot e altri, Immunogenetics 1997, 45:320-324).

Alcune mutazioni nel gene della ferroportina recentemente denominato SLC40A1, e noto in precedenza anche come SLC11A3 o IREG-1 o MTP-1, sono infatti già state identificate sia dagli stessi autori della presente invenzione che da altri come descritto ad esempio in: Montosi et al., J. Clin. Invest., 2001, 108:619 ed in WO 02/033119; Devalia V et al., Blood, 2002, 100:695; Cazzola et al., British Journal of Hematology 2002, 119:539; Wallace et al., Blood, 2002, 100:692; Njajou Nat. Genet. 2001, 28:213

L'identificazione del maggior numero di modificazioni genetiche responsabili di emocromatosi ereditaria o di patologie legate ad una alterata omeostasi del ferro è di grande importanza sia diagnostica che terapeutica. Infatti, a tutt'oggi la diagnosi dell'emocromatosi avviene tardivamente ed è basata sulla sintomatologia clinica che si sviluppa in seguito a lesioni tessutali spesso irreversibili. Inoltre, la diagnosi di tale patologia è resa difficoltosa dal fatto che i suoi sintomi sono spesso simili a quelli di altre patologie caratterizzate da alterata omeostasi del ferro.

Lo sviluppo di metodi di screening genetico per la diagnosi precoce, in fase presintomatica, dell'emocromatosi ereditaria permetterebbero di intervenire tempestivamente con la flebotomia prevenendo in tal modo danni ad organi e tessuti.

Inoltre, l'identificazione delle alterazioni genetiche associate all'emocromatosi ereditaria e la comprensione del ruolo che esse svolgono nello sviluppo della patologia sono di estrema importanza per la messa a punto di nuovi e migliori strategie terapeutiche.

SOMMARIO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione riguarda polinucleotidi isolati codificanti per una ferroportina 1 mutata in almeno una delle posizioni corrispondenti ai seguenti amminoacidi: posizione 80, posizione 174 o in posizione 248 della seq IDN2. L'identificazione di tali mutazioni sulla proteina o sugli acidi nucleici per essa codificanti è di estrema utilità per la diagnosi e la terapia di emocromatosi non HFE dipendenti, della siderosi Bantu o emocromatosi africana o della predisposizione a tali malattie.

L'invenzione riguarda quindi inoltre i metodi per la diagnosi molecolare basati sull'uso di oligonucleotidi derivati da tali sequenze o sugli anticorpi specifici per tali mutazioni.

L'invenzione comprende inoltre anche i kit diagnostici per l'identificazione di tali polimorfismi.

DESCRIZIONE DELLE FIGURE

Figura 1: Mutazione G80. Risultato dell'analisi diagnostica dei membri della famiglia sani o affetti da emocromatosi.

Nel pannello A è rappresentata la relazione tra gli individui analizzati (*pedigree*) nella famiglia recante la mutazione G80. I soggetti affetti da emocromatosi sono indicati in nero, mentre quelli sani in bianco. I cerchi indicano i soggetti di sesso femminile mentre i quadrati quelli di sesso maschile. Nel pannello B è visualizzato l'elettroferogramma fornito dal sequenziatore automatico sul frammento di DNA amplificato secondo l'invenzione da un controllo (che non porta il polimorfismo) e da un individuo malato (che porta il polimorfismo). Nel pannello C è rappresentato il profilo di restrizione ottenuto in seguito a digestione con



TspR1 del DNA genomico amplificato da ciascun individuo con i primers di sequenza IDN13 e IDN14. Come indicato nel pannello B nel caso di soggetti sani, che presentano solo la sequenza *wild type*, in seguito a digestione con TspR1 il DNA amplificato, di 421 paia di basi, non viene digerito. Nei soggetti affetti dalla patologia, eterozigoti per la mutazione, il DNA amplificato viene digerito in una banda di 421 paia di basi (allele normale) e due bande di 238 e 183 paia di basi (quest'ultima non visibile in Figura 2b). (+/+): Soggetti omozigoti per la ferroportina *wild type*, (+/-): soggetti eterozigoti per la mutazione.

Figura 2. Mutazione N174. Risultato dell'analisi diagnostica dei membri della famiglia sani o affetti da emocromatosi.

Nel pannello A è rappresentata la relazione tra gli individui analizzati (*pedigree*) nella famiglia recante la mutazione N174. I soggetti affetti da emocromatosi sono indicati in nero, mentre quelli sani in bianco. I cerchi indicano i soggetti di sesso femminile mentre i quadrati quelli di sesso maschile. Nel pannello B è visualizzato l'elettroferogramma fornito dal sequenziatore automatico sul frammento di DNA amplificato secondo l'invenzione da un controllo (che non porta il polimorfismo) e da un individuo malato (che porta il polimorfismo).

Nel pannello C sono rappresentati i profili di restrizione ottenuti in seguito a digestione con BsmI del DNA amplificato da individui sani o affetti dalla patologia con i primers di sequenza IDN19 e IDN20. Nel caso di soggetti sani che presentano solo la sequenza *wild type*, in seguito a digestione con BsmI il DNA amplificato, di 425 paia di basi, viene digerito in due frammenti di 342 e 83 paia di basi. Nei soggetti affetti dalla patologia il

polimorfismo determina perdita della sequenza di riconoscimento per l'enzima di restrizione e quindi il DNA amplificato non viene digerito. Poiché i soggetti portatori della patologia sono eterozigoti per la mutazione, in seguito a digestione con BsmI si otterranno tre bande: una banda di 425 paia di basi (allele mutato) e due bande di 342 e 83 paia di basi (allele wild-type).

(+/-): Soggetti omozigoti per la ferroportina wild type, (+/-): soggetti eterozigoti per la mutazione.

Figura 3. Mutazione Q248. Risultato dell'analisi diagnostica dei membri della famiglia sani o affetti da siderosi Bantu.

Nel pannello A è riportata la sequenza parziale dell'esone 6 in cui è stata trovata la mutazione in soggetti con siderosi africana e neri americani. La Figura 3b indica rappresenta il profilo di restrizione ottenuto in seguito a digestione con PvuII del DNA amplificato da vari individui con i primers di sequenza IDN19 e IDN20. Come indicato nella Figura 3b, nel caso di soggetti sani che presentano solo la sequenza *wild type*, il DNA amplificato di 425 paia di basi, viene digerito con l'enzima di restrizione PvuII. La mutazione abolisce il sito di riconoscimento dell'enzima e in un soggetto eterozigote un allele viene digerito e l'altro no così che si otterranno tre bande: una banda di 425 paia di basi (allele mutato) e due bande di 302 e 123 paia di basi (allele wild-type).

(+/-): Soggetti omozigoti per la ferroportina wild type, (+/-): soggetti eterozigoti per la mutazione.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

Gli autori della presente invenzione hanno identificato nuove mutazioni

localizzate nel gene SLC40A1 (Solute Carrier Family) codificante per la ferroportina 1 (o IREG1 o MTP1), denominato in precedenza anche SLC11A3, geneticamente legate alla presenza di emocromatosi ereditaria o di una alterata omeostasi del ferro non dipendente dal gene HFE (Hereditary Hemochromatosis).

Le mutazioni descritte nella presente invenzione sono state localizzate nel gene SLC40A1 codificante per la ferroportina, in corrispondenza dei codoni per gli aminoacidi G80, N174 e Q248 della ferroportina 1 dove tale numerazione è riferita alla sequenza wild type identificata con numero di accesso NM_014585 (GenBank) e fornita nel listato sequenze allegato con il numero identificativo 1 (seqIDN1, wild type). A livello genomico, le mutazioni localizzano rispettivamente nel 3° esone (mutazione G80), e nel 6° esone (mutazione N174 e mutazione Q248) del gene SLC40A1.

Tali mutazioni determinano sostituzioni amminoacidiche nella corrispondente proteina, la cui espressione in forma mutata determina un accumulo di ferro anomalo in individui portatori. Da un punto di vista funzionale infatti, la ferroportina riveste un ruolo chiave in almeno due aspetti diversi ma correlati, dell'omeostasi del ferro: negli enterociti la ferroportina determina l'assorbimento del ferro introdotto con la dieta, mentre nelle cellule reticolendoteliali, in particolare nei macrofagi, essa determina il rilascio del ferro dai depositi (store) intracellulari. Tali nuove mutazioni sono responsabili di emocromatosi e caratterizzate da tratti clinici almeno parzialmente simili da quelli già descritti in Pietrangelo et al. New England Journal of Medicine 1999, 341 (10): 725-732, dovuti alla

mutazione A77D descritta in WO02/033119.

L'invenzione riguarda quindi in un suo primo aspetto polinucleotidi polimorfici rispetto alla sequenza SLC40A1, codificanti per forme della ferroportina 1 mutate rispetto al wild type e riguardanti almeno uno dei seguenti polimorfismi:

- polimorfismo del nucleotide corrispondente al nucleotide 238 della sequenza IDN1, preferibilmente relativo alla sostituzione di una guanina con una adenosina (G A), che determina la sostituzione dell'aminoacido 80 con un aminoacido diverso da glicina e preferibilmente con serina (G80S) nella proteina codificata: il cDNA derivato da tale gene polimorfico ha preferibilmente sequenza IDN3;
 - polimorfismo del nucleotide corrispondente al nucleotide 521 della sequenza IDN1, preferibilmente relativo alla sostituzione di una adenina con una timina (A T), che determina la sostituzione dell'aminoacido 174 con un aminoacido diverso da asparagina, preferibilmente con isoleucina (N174I) nella proteina codificata: il cDNA derivato da tale gene polimorfico ha preferibilmente sequenza IDN5;
 - Polimorfismo del nucleotide corrispondente al nucleotide 744 della sequenza IDN1, preferibilmente relativo alla sostituzione di una guanina con timina (G T), che determina la sostituzione dell'aminoacido 248 con un aminoacido diverso da glutammina e preferibilmente con istidina (Q248H) nella proteina codificata: il cDNA derivato da tale gene polimorfico ha preferibilmente sequenza IDN7;
- o i loro frammenti oligonucleotidici aventi lunghezza di almeno 10 basi.



Sulla base della numerazione del cDNA wild type corrispondente al numero di accesso GenBank N° NM_0145585, sequenza riportata parzialmente in seq IDN1, i polinucleotidi isolati secondo l'invenzione comprendono quindi almeno una delle seguenti sostituzioni: guanina in posizione 552, preferibilmente con adenina, adenina in posizione 835 preferibilmente con timina, guanina in posizione 1058, preferibilmente con timina: con tale numerazione ci si intende riferire alla numerazione della sequenza di cui sopra in GenBank.

Gli oligonucleotidi dell'invenzione possono essere sintetizzati per via chimica o enzimatica, oppure mediante digestione di polinucleotidi isolati con enzimi di restrizione.

Una realizzazione preferita di tali polinucleotidi è rappresentata dalle sequenze IDN3, IDN5, e IDN7, o loro frammenti aventi una lunghezza di almeno 10 nt e comprendenti almeno una delle sostituzioni polimorfiche sopra identificate, dove tali sequenze corrispondono al cDNA codificante per ciascuna delle forme di ferroportina 1 mutata sopra descritte.

Quando il polinucleotide è DNA esso può essere a singola oppure a doppia elica, preferibilmente l'oligonucleotide è a singola elica. I poli- o gli oligonucleotidi secondo l'invenzione possono comprendere basi modificate, quali ad esempio i nucleotidi tioderivati.

L'invenzione comprende inoltre i polinucleotidi e gli oligonucleotidi con sequenza complementare ai polinucleotidi e agli oligonucleotidi dell'invenzione, e caratterizzati dal fatto di comprendere il nucleotide complementare ad almeno 1 dei nucleotidi polimorfici sopra descritti.

Preferibilmente essi sono complementari alla seq IDN1, 3 e 5 o loro

frammenti, nonché agli oligonucleotidi di almeno 10 basi comprendenti almeno uno dei polimorfismi: in particolare quindi comprendenti il nucleotide complementare al polimorfismo del nucleotide 238 della sequenza IDN1, oppure quello complementare al polimorfismo del nucleotide 521 della sequenza IDN1, oppure quello complementare al polimorfismo del nucleotide 744 della sequenza IDN1.

I polinucleotidi ed i nucleotidi complementari alla sequenza della ferroportina di cui sopra, possono essere utilizzate per regolare in modo specifico l'espressione dei trascritti corrispondenti o possono essere utilizzati come sonde specifiche per rilevare la presenza di almeno uno dei polimorfismi sopra descritti.

Gli oligonucleotidi ed i polinucleotidi dell'invenzione possono essere anche solo parzialmente identici o parzialmente complementari alle sequenze della ferroportina identificate con le seq IDN3, 5, 7 o loro frammenti e comprendere quindi regioni di non omologia o di non identità. La regione di complementarietà o di omologia con la ferroportina o con il suo complementare è in questo caso di almeno 10 nucleotidi.

In particolare per gli oligonucleotidi è indispensabile che tali ulteriori nucleotidi aggiunti preferibilmente al 5' o al 3' non alterino la specificità nel rivelare i polimorfismi.

Sequenze complementari tra di loro sono in grado di ibridizzare in condizioni stringenti e quindi in modo specifico le une alle altre. Pertanto i polinucleotidi o gli oligonucleotidi complementari dell'invenzione sono caratterizzati dal fatto di ibridizzare specificamente ai polinucleotidi o alle sequenze che portano le mutazioni nei siti polimorfici in particolare alle

sequenze IDN 3, 5 o 7 o ai loro frammenti od oligonucleotidi.

Sono inoltre compresi nella presente invenzione gli oligonucleotidi che portano all'amplificazione di regioni di DNA genomico o di cDNA comprendenti le mutazioni descritte, di cui una realizzazione preferita è rappresentata dagli oligonucleotidi di sequenza IDN 9-22, che amplificano a coppie il DNA genomico nelle regioni esoniche da 1 a 7 (ad es. i primer di sequenza IDN9 e 10 amplificano l'esone 1, seqIDN11 e 12 l'esone 2 e così via come descritto nella parte sperimentale in maggior dettaglio). Particolarmente preferiti sono la coppia di oligonucleotidi di sequenza IDN13 e 14 che amplifica il DNA genomico a livello dell'esone 3, comprendente il polimorfismo corrispondente al nucleotide 238 della seqIDN1, e la coppia IDN19 e 20 che amplifica la regione esonica dell'esone 6, comprendente i polimorfismi corrispondenti ai nucleotidi 521 e 744 della seqIDN1.

Per " frammento nucleotidico " o polinucleotide secondo la presente invenzione si intende un acido nucleico con una sequenza parziale rispetto alla seqIDN 3, 5 e 7, avente una lunghezza superiore a 50 nucleotidi e comprendente almeno una delle mutazioni o polimorfismi descritti.

Per "oligonucleotide" secondo la presente invenzione si intende un acido nucleico con una sequenza parziale rispetto alle seqIDN3, 5 e 7 ed una lunghezza minima di 10 paia di basi.

Secondo un ulteriore ed importante aspetto l'invenzione riguarda quindi inoltre una proteina, la ferroportina 1, in forma sostanzialmente isolata e purificata, avente sequenza aminoacidica mutata rispetto alla sequenza

wild type rispettivamente in posizione corrispondente all'amminoacido glicina 80, oppure in posizione corrispondente all'amminoacido asparagina 174, oppure in posizione corrispondente all'amminoacido glutammina 248, rispetto alla sequenza aminoacidica dedotta dal cDNA corrispondente al n° di accesso NM_014585 (GenBank).

Le posizioni numeriche dell'amminoacido sulla proteina hanno come unico scopo di identificarlo in maniera univoca potendo variare a causa ad esempio della presenza di ulteriori mutazioni specie-specifiche o a causa della presenza di inserzioni o delezioni nelle regioni codificanti per sequenze a monte di detto amminoacido.

La mutazione G80S determina il cambio di glicina un amminoacido a polarità intermedia del P.M. di 75 in serina, un amminoacido idrofilico di P.M. 105. La mutazione N174I determina il cambio di asparagina, un amminoacido idrofilico non carico di P.M. 132 a isoleucina un amminoacido idrofobico, non carico di P.M. 131. La sostituzione dell'amminoacido 174 è di importanza cruciale per la proteina poiché è un sito di glicosilazione.

Inoltre la mutazione in posizione corrispondente all'amminoacido 248 della ferroportina 1 è indicatore della forma africana di emocromatosi ereditaria, denominata siderosi africana, geograficamente localizzata nelle regioni Sud-sahariane e caratterizzata da accumulo di ferro prevalentemente nel sistema reticoloendoteliale con aumento della ferritinemia precoce e non sempre accompagnato da una totale saturazione della transferrina circolante. Questi tratti sono sorprendentemente simili alla malattia della ferroportina descritta (Pietrangelo et al. New England Journal of Medicine 1999, 341 (10): 725-



732).

Alcuni dei tratti clinici associati con le mutazioni sopra descritte sono qui di seguito indicati:

- i) nei portatori della mutazione G80S: aumenta la ferritinemia tra 1000 e 2000 ng/ml nei soggetti maschi non trattati; mentre nelle femmine la ferritina usualmente non supera i 700 ng/ml anche in donne anziane, in epoca postmenopausa;
- ii) nei portatori della mutazione N174I: è osservabile un notevole aumento della ferritinemia che supera i 4000 ng/ml anche nelle femmine. E' verosimile che la mutazione abbia un effetto strutturale e funzionale sulla proteina più severo delle altre mutazioni;
- iii) nei portatori della mutazione Q248H: è osservabile in soggetti di colore americani o africani. La mutazione ha un effetto aggravante su una condizione preesistente di eccesso di ferro. Nei pazienti americani trovati, affetti da uno stato portatore di talassemia, provoca un fenotipo più grave, con iperferritinemia e deposito di ferro nelle cellule reticoloendoteliali (macrofagiche) del midollo e del fegato -quadro tipico della malattia descritta dagli stessi autori della presente invenzione nel 1999 (Pietrangelo et al. 1999) pur senza che i pazienti abbiano subito trasfusioni di sague (pratica che può portare ad accumulo di ferro nelle cellule macrofagiche). Nei pazienti africani affetti da siderosi Bantu (legata cioè all'accumulo eccessivo di birra preparata in recipienti di ferro) è responsabile di una iperferritinemia più elevata dei soggetti che non hanno la mutazione ma consumano livelli simili di alcool. Paradossalmente, la presenza della mutazione determina anche una

condizione di anemia, con calo altamente significativo dell'emoglobina.

Inoltre, la mutazione è un marcatore della popolazione nera di origine africana che non risulta presente in alcuno dei donatori sani di origine caucasica, come dimostrato specularmente dal fatto che su 100 cromosomi di soggetti africani apparentemente normali, 6 di questi cromosomi presentavano la mutazione; analogamente sul DNA di 100 donatori anonimi di colore americani, la mutazione è stata ritrovata in 4 soggetti. L'analisi di questi soggetti apparentemente sani ha mostrato una tendenza della ferritinemia a valori più elevati ed una emoglobinemia significativamente più bassa rispetto a quelli senza mutazione. La mutazione quindi in associazione ad altri fattori (ad es. consumo alcolico, talassemia) dà un fenotipo più severo. Inoltre, nella popolazione nera africana ed americana potrebbe contribuire a determinare i livelli di emoglobina tendenzialmente più bassi, e di ferritinemia, tendenzialmente più alti, come descritto maggiormente in dettaglio nella parte sperimentale di commento alla tabella 1.

E' tuttavia da tener presente che i valori di emoglobina o di ferritinemia di per sé non costituiscono indicazione diagnostica dell'emocromatosi non dipendente dal gene HFE se non in associazione alla presenza di almeno una delle mutazioni descritte nell'invenzione. Tali valori possono quindi scostarsi da quanto riportato sopra, anche in dipendenza da altri fattori quali l'età del soggetto, o il momento in cui viene effettuata la diagnosi, etc.

Secondo un ulteriore aspetto l'invenzione comprende peptidi o polipeptidi di lunghezza superiore a 5 aminoacidi aventi sequenza

parziale corrispondente a quella della proteina ferroportina 1 e caratterizzati dal fatto di comprendere le mutazioni nelle posizioni amminoacidiche corrispondenti alla glicina in posizione 80, all'asparagina in posizione 174 o alla glutammina in posizione 248. Tali peptidi o polipeptidi sono ottenuti mediante sintesi chimica oppure con metodi ricombinanti. Preferibilmente i polipeptidi comprendenti almeno una della mutazioni sopra identificate e di lunghezza superiore a 100 aminoacidi, sono ottenuti mediante le tecniche del DNA ricombinante, mentre peptidi comprendenti almeno una della mutazioni sopra identificate, di lunghezza inferiore a 100 aminoacidi sono preferibilmente ottenuti mediante sintesi chimica.

Secondo la predizione di struttura presentata in Davalia et al. le mutazioni G80 e N174 sono localizzate nei domini extracellulari della ferroportina, mentre la mutazione Q248 è la prima mutazione che mappa in un dominio intracellulare rappresentato, secondo questa predizione, dagli aminoacidi 221-306. Il dominio comprendente tale mutazione rappresenta quindi un ulteriore oggetto dell'invenzione, in quanto per la prima volta sorprendentemente legato a polimorfismi che determinano tratti clinici simili a quelli della emocromatosi ereditaria non dipendente dal gene HFE ed in grado di determinare un fenotipo più severo in associazione ad altri fattori (ad es. consumo alcolico, talassemia). Ovviamente l'alterazione della funzionalità della ferroportina in seguito alla mutazione Q248 è indipendente dall'assegnazione ad un dominio intra o extra- cellulare del modello di predizione di struttura secondaria o terziaria ed è quindi indipendente dalla validità di tal modello di

predizione.

In un suo ulteriore aspetto l'invenzione riguarda peptidi aventi sequenza derivata dalla seq IDN 2 (o 4 o 6 o 8), con una lunghezza di almeno 5 aminoacidi e comprendenti l'aminoacido corrispondente alla posizione 80, 174 e 248 di SEQ ID NO: 2 (o 4 o 6 o 8) e gli aminoacidi immediatamente a valle e/o a monte di questi. La lunghezza e la sequenza di tali peptidi sono scelti in base a criteri noti al tecnico del ramo a seconda dell'applicazione che se ne desidera fare. Realizzazione preferita di tali peptidi sono i peptidi corrispondenti a: Ile-Ile-X-Asp-Trp (G80) dove X è diverso da glicina ed è preferibilmente serina; Asn-Met-X-Ala-Thr, dove X è diverso da asparagina ed è preferibilmente isoleucina; Leu-Lys-X-Leu-Asn, dove X è diverso da glutammina ed è preferibilmente istidina; sono inoltre compresi nella presente invenzione i polipeptidi comprendenti tali peptidi. Essi risultano utili ad esempio per identificare la presenza di una delle mutazioni descritte mediante saggi di competizione, in un materiale cellulare o proteico, quale ad esempio un estratto cellulare, oppure in immunosaggi diagnostici. Tali peptidi possono comprendere all'N o al C-terminale aminoacidi non derivati dalla sequenza della ferroportina ed aventi funzione diversa, ad esempio peptidi "tag" per facilitare la purificazione.

Per convenzione ed ai fini della presente invenzione, con il termine frammento della proteina ferroportina o polipeptide secondo l'invenzione, si intende una molecola avente sequenza parziale rispetto alla proteina ferroportina 1 mutata come descritto e comprendente almeno una di dette mutazioni ed avente una lunghezza superiore a 50 aminoacidi



Con il termine peptide secondo l'invenzione si intende una molecola avente come sequenza una sequenza parziale della proteina ferroportina 1 mutata, e comprendente almeno una di dette mutazioni ed avente una lunghezza di almeno 4 aminoacidi, ma inferiore o uguale a 50 aminoacidi.

Rientrano inoltre nella portata della presente invenzione anticorpi in grado di riconoscere in modo specifico, rispetto alla proteina wild type almeno una delle mutazioni G80, N174 e Q248. Tali anticorpi specifici sono di utilità diagnostica in quanto la presenza di una ferroportina recante almeno una delle mutazioni descritte costituisce indicatore diagnostico anche precoce di una alterata omeostasi del ferro su base ereditaria.

Data la alta incidenza dell'emocromatosi ereditaria non dipendente dal gene HFE (64% delle forme di emocromatosi italiana) e nel resto del mondo dove sono stati riportati casi in etnie caucasiche, asiatiche ed altre, e la sua costante progressione, i polinucleotidi, gli oligonucleotidi, i polipeptidi o i peptidi, le forme di ferroportina mutata comprendenti le mutazioni descritte, nonché gli anticorpi specifici per le mutazioni identificate nella proteina, hanno una chiara applicazione in campo farmaceutico sia nel settore diagnostico che in quello terapeutico.

In campo diagnostico i prodotti nucleotidici e polipeptidici dell'invenzione sono importanti per la diagnosi dell'emocromatosi ereditaria non legata al gene HFE, preferibilmente per la diagnosi dell'emocromatosi africana e nord-americana, per la diagnosi differenziale delle iperferritinemie ereditarie o congenite, o per la diagnosi di anemie da causa ignota in

giovani donne o delle iperferritinemie da causa ignota in bambini ed adulti.

In particolare nell'emocromatosi Bantu o siderosi africana la diagnosi del polimorfismo Q248 risulta essere particolarmente utile per rivelare la base genetica di un fenotipo più severo o del rischio di sviluppare un tale fenotipo in associazione con altri fattori (ad es. consumo alcolico o la talassemia). La mutazione Q248 risulta inoltre di particolare importanza per rivelare la base genetica di una alterata omeostasi del ferro che nei portatori di tale polimorfismo è associata con livelli normali di ferritinemia ma con livelli alterati di emoglobinemia.

La diagnosi molecolare *in vitro*, basata sulla rivelazione delle mutazioni del DNA o della proteina descritte nella presente invenzione, e resa possibile dai metodi e dai reagenti descritti nella presente invenzione, consente la diagnosi precoce dell'emocromatosi ereditaria. La diagnosi precoce è indispensabile per una patologia che rimane in genere asintomatica fino ai 30 anni, e viene spesso diagnosticata solo in seguito agli effetti secondari del deposito di ferro a livello degli organi interessati (polmoni, fegato, articolazioni, pancreas) nel momento in cui la loro funzionalità è già compromessa in modo irreparabile.

Gli oligonucleotidi e i polinucleotidi comprendenti il polimorfismo responsabile della mutazione Q248 sono inoltre di utilità come marcatori genetici per la popolazione nera di origine africana e sono utilizzati in studio del legame (linkage) genetico di malattie i cui geni mappano sullo stesso cromosoma.

Gli acidi nucleici dell'invenzione sono di utilità in campo terapeutico, in

particolare nella terapia genica sostitutiva, dove mediante ricombinazione omologa con sequenze wild type e/o per la terapia cellulare rappresentano il bersaglio di tali sequenze. Infatti, poiché la presenza in un individuo di un gene recante almeno una delle mutazioni dell'invenzione e del prodotto (ferroportina 1 mutata) da esso codificata è correlata con l'insorgenza di emocromatosi ereditaria, risulta molto importante disporre di mezzi per bloccare l'espressione del gene od inattivare la proteina. L'invenzione si riferisce quindi a composizioni farmaceutiche comprendenti detti oligonucleotidi, anticorpi o peptidi miscelati con eccipienti farmaceuticamente accettabili.

In una delle applicazioni più comuni gli acidi nucleici dell'invenzione, preferibilmente gli oligonucleotidi di lunghezza inferiore a 50bp, preferibilmente di almeno 40 bp o ancor più preferibilmente di lunghezza compresa tra 8-25, o 8-15 nucleotidi sono utilizzati per verificare la presenza in un campione biologico dei polimorfismi su indicati.

Pertanto rientra nell'ambito della presente invenzione l'uso terapeutico di dei polinucleotidi ed oligonucleotidi dell'invenzione. Tipicamente detti oligonucleotidi comprendono i polimorfismi sopra descritti o hanno sequenza complementare alla regione comprendente detti polimorfismi e sono pertanto oligonucleotidi o polinucleotidi allele-specifici.

Preferibilmente gli oligonucleotidi o gli acidi nucleici dell'invenzione comprendono i seguenti decameri o le sequenze ad essi complementari:
5' ATCAGTGACT 3' (seqID 23) comprendente il polimorfismo, sottolineato e responsabile della mutazione G80S, 5' GATGAITGCC 3' (seqIDN 24) comprendente il polimorfismo sottolineato e responsabile

della mutazione N174I, 5' GAAACAICTG 3' (seqIDN 25) comprendente il polimorfismo sottolineato e responsabile della mutazione Q248H. Essi possono pertanto comprendere nucleotidi addizionali al 5' o al 3' quando questi non ne alterino la specificità di riconoscimento, ad esempio per ibridazione ad una sequenza di ferroportina, per i polimorfismi la cui valenza terapeutica e diagnostica sono qui descritti quale oggetto della presente invenzione.

I polinucleotidi dell'invenzione, in particolare le sequenze IDN 3, 5, 7 o i loro frammenti, possono essere inoltre utilizzate per la produzione di molecole di ferroportina 1 ricombinante o di proteine chimeriche o di forme tronche della proteina comprendenti almeno uno tra gli amminoacidi mutati in posizione G80, N174, Q248. Essi sono inseriti in vettori d'espressione ed utilizzati per la trasformazione di cellule procariote o eucariote secondo tecniche ben note nell'arte quali ad, esempio, trasfezione, trasformazione, infezione o iniezione intranucleare. Vettori adatti a questo scopo includono, ad esempio, plasmidi, vettori di origine virale e cromosomi artificiali di lievito o di mammifero.

Secondo una ulteriore applicazione, l'invenzione si riferisce pertanto a un vettore ricombinante comprendente un acido nucleico o un frammento di DNA secondo l'invenzione così come a cellule eucariote o procariote trasformate con detto vettore.

L'esperto del ramo è in grado di scegliere di volta in volta frammenti e oligonucleotidi aventi sequenza e lunghezza adatte all'utilizzo che se ne desidera fare. Ad esempio, qualora detti frammenti o oligonucleotidi vengano utilizzati per l'individuazione della mutazione dell'invenzione



tramite tecniche di ibridazione essi devono avere lunghezza e sequenza tale da essere in grado di ibridarsi in modo specifico, in condizioni stringenti, ad una sequenza dell'acido nucleico comprendente il codone mutato.

Le sonde oligonucleotidiche allele-specifiche hanno lunghezza superiore a 10 nucleotidi, preferibilmente compresa tra 15 e 50 nucleotidi e ancor più preferibilmente non superiore a 35 nt, preferibilmente compresa tra 15 e 30 nucleotidi. La scelta della sequenza di tali sonde è alla portata del tecnico del ramo che le seleziona sulla sequenza intera anche mediante software conosciuto ed in dipendenza del saggio in verranno utilizzate. Preferibilmente esse comprendono almeno uno tra gli oligonucleotidi di sequenza IDN23, 24 o 25 i quali sono caratterizzati dal fatto di comprendere rispettivamente i polimorfismi del nucleotide 238, del nucleotide 521 del nucleotide 744, secondo la numerazione di seq IDN1.

I frammenti e gli oligonucleotidi dell'invenzione possono essere marcati, ad esempio con uno o più marcatori scelti tra: radioisotopi, enzimi, biotina-avidina o altre molecole fluorescenti adatte a visualizzarli tramite specifici saggi.

Secondo un ulteriore aspetto l'invenzione riguarda gli oligonucleotidi ed i polinucleotidi caratterizzati dal fatto di comprendere i polimorfismi su descritti e gli acidi nucleici ad essi complementari, nonché i peptidi e le proteine ferroportina in forma mutata per uso terapeutico. In buona sostanza data l'importanza e l'incidenza dell'emocromatosi su base ereditaria l'invenzione comprende tutti gli acidi nucleici e le proteine

dell'invenzione per uso terapeutico. Secondo un aspetto preferito l'invenzione comprende gli acidi nucleici di sequenza IDN 3, 5 e 7 e loro frammenti, gli oligonucleotidi comprendenti le sequenze IDN23-25, e quelli ad essi complementari, le proteine di sequenza IDN 4, 6, 8 ed i peptidi da esse derivate comprendenti la sostituzione aminoacidica derivata dal polimorfismo, per uso terapeutico.

I polinucleotidi secondo l'invenzione possono inoltre utilizzati per la preparazione di cellule e di mammiferi transgenici non umani comprendenti il transgene codificante per almeno una delle forma mutate della ferroportina 1 dell'invenzione. Il transgene può essere integrato stabilmente nel genoma della cellula animale oppure essere presente in forma transiente.

Dette cellule, tessuti o animali non umani sono utili come modelli per lo studio della funzionalità del gene e della proteina comprendenti la mutazioni secondo l'invenzione e del loro ruolo nell'insorgenza della emocromatosi ereditaria. Questi modelli sono di particolare importanza per lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici per la cura dell'emocromatosi ereditaria non dipendente dal gene HFE o di una alterata omeostasi nell'accumulo di ferro.

In un ulteriore aspetto l'invenzione si riferisce ad un metodo per la diagnosi *in vitro* di emocromatosi ereditaria non legata al gene HFE, o di siderosi africana o di emocromatosi Bantu in un mammifero, preferibilmente Homo Sapiens anche in casi in cui l'unico tratto clinico evidenziabile sia solo iperferritinemia o anemia e comprendente i seguenti passaggi:

- a) isolamento degli acidi nucleici contenuti in un campione biologico ottenuto da detto mammifero;
- b) verifica della presenza in detto acido nucleico di una mutazione o di un polimorfismo secondo l'invenzione,

dove la presenza di almeno una di dette mutazioni o polimorfismi costituisce una indicazione che detto mammifero è affetto da una anomalia ereditaria nella regolazione dell'omeostasi di ferro, o più in particolare è affetto da emocromatosi ereditaria non-HFE, da siderosi africana, da anemia ereditaria con iperferritinemia o da malattia ereditaria da accumulo reticoloendoteliale del ferro.

Preferibilmente detto campione biologico è un campione di plasma, saliva, urina, feci, liquido amniotico o tessuto o è rappresentato da cellule derivate da biopsie. Preferibilmente detto acido nucleico è DNA genomico o RNA. Nel caso in cui esso sia RNA, esso viene preferibilmente trasformato in DNA complementare (cDNA) tramite una reazione di trascrizione inversa.

Il DNA genomico o il cDNA sono analizzati direttamente oppure in seguito ad amplificazione *in vitro* tramite *polymerase chain reaction* (PCR) (Saiki e altri, Science 239: 487-491, 1988) o altre tecniche quali, ad esempio, *ligase chain reaction* (LCR) (Wu e altri, Genomics 4: 560-569, 1989) *strand displacement amplification* (SDA) (Walker e altri, PNAS USA 89: 392-396) o *self-sustained sequence replication* (3SR) (Fahy e altri, PCR Methods Appl. 1: 25-33, 1992).

Preferibilmente, il DNA genomico o il cDNA viene amplificato tramite PCR utilizzando una coppia di oligonucleotidi adatti all'amplificazione del

frammento di DNA comprendente il codone codificante l'aminoacido corrispondente alla posizione 80 o la 174 o la 248 di SEQ ID NO:2.

Coppie di oligonucleotidi adatti per amplificare la regione contenente la mutazione G80 sul DNA genomico sono quelli che amplificano il 3° esone e la cui sequenza corrisponde alle SEQ ID No:13 e SEQ ID No:14, mentre oligonucleotidi idonei all'amplificazione della regione comprendente la mutazione N174 e Q248 sul 6° esone sono quelli di sequenza SEQ ID No: 19 e SEQ ID No: 20. Gli oligonucleotidi di sequenza IDN9-22 rientrano pertanto nell'ambito della presente invenzione. Particolarmente preferita è la coppia di oligonucleotidi che amplifica la regione del 3° esone comprendente il polimorfismo responsabile della mutazione G80 cioè la coppia costituita dalle sequenze IDN13 e 14 e la coppia di oligonucleotidi che amplifica la regione del 6° esone comprendente il polimorfismo responsabile della mutazione Q248 ed il polimorfismo responsabile della mutazione N174, quali la coppia costituita dalle sequenze IDN19 e 20. Oligonucleotidi aventi specificità per gli esoni recanti le mutazioni possono essere identificati sulla sequenza del DNA genomico adiacente alle sequenze identificate con tali oligonucleotidi. Rientrano quindi nella presente invenzione oligonucleotidi comprendenti almeno 8 nucleotidi di ciascuno degli oligonucleotidi di sequenza IDN9-22, preferibilmente di seqIDN13 e 14 e 19-20.

Numerose tecniche, ben note nell'arte, possono essere utilizzate per individuare nel DNA genomico o nel cDNA la presenza delle mutazioni secondo l'invenzione. Tecniche adatte sono, ad esempio, tecniche



basate sull'utilizzo di enzimi di restrizione (Kan e altri, Lancet: 910-912, 1978), tecniche di ibridazione con sonde oligonucleotidiche allele-specifiche (Wallace ed altri, Nucl Acids Res 6: 3543-3557, 1978) tra cui, ad esempio, ibridazione con oligonucleotidi immobilizzati su filtri (Saiki e altri, PNAS USA 86: 6230-6234, 1989) o micro-chips (Chee e altri, Science 274:610-614, 1996) e *oligonucleotide arrays* (Maskos e altri, Nucl Acids Res 21: 2269-2270, 1993), PCR allele-specifica (Newton e altri Nucl Acid Res 17:2503-2516, 1989), *mismatch repair detection (MRD)* (Faham e Cox Genome Res: 474-482, 1995), *Single-strand conformational polymorphism analysis* (Ravnik-Glavac *et al*, Hum. Mol. Gen. 3: 801, 1994), gel elettroforesi in gradiente denaturante (Guldborg *et al.*, Nucl. Acids Res. 22: 880, 1994), *Hot Cleavage* (Cotton *et al.* Proc.Natl. Acad Sci USA 85: 4397, 1988), *DNAse* (Youil e altri, PNAS USA 92: 87-91, 1995) e *RNAse protection assay* (Winter *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 7575, 1985; Meyers *et al.*, Science 230: 1242, 1985), *allele specific primer extension* (Syvanen e altri, Genomics 8: 684-692, 1990 e Syvanen e altri, Hum Mutat 13:1-10, 1999), *genetic bit analysis* (GBA) (Nikiforov e altri Nucl Acid Res 22:4167-4175, 1994), *primer-ligation assay* (OLA) (Landerger e altri, Science 241: 1077, 1988), *allele specific ligation chain reaction* (LCR) (Barrany PNAS USA 88:189-193, 1991), *gap-LCR* (Abravaya e altri Nucl Acids Res 23: 675-682, 1995), tecniche di sequenziamento, oppure Ligase Detection Reaction (descritta in US 6,312,892). Tecniche particolarmente preferite per l'individuazione della mutazione dell'invenzione sono tecniche basate sull'utilizzo di enzimi di restrizione, che è presente solo se è presente il

polimorfismo su indicato, sulla PCR allele specifica, sull'ibridazione, sul sequenziamento diretto o su set o microarray "computer readable"

Pertanto, secondo una prima applicazione preferita la verifica della presenza nel DNA analizzato della mutazione secondo l'invenzione avviene utilizzando tecniche basate sull'utilizzo di enzimi di restrizione e comprende i seguenti stadi:

- a) amplificazione del DNA genomico o del cDNA con una coppia di oligonucleotidi adatta all'amplificazione selettiva di un segmento di detto DNA comprendente il codone codificante l'aminoacido corrispondente alla posizione G80 o N174 o Q 248, dove preferibilmente tale amplificazione avviene con le coppie di oligonucleotidi 13 e 14 per le mutazioni sul 3° esone (G80) e con la coppia di oligonucleotidi 19 e 20 per le mutazioni sul 6° esone (N174 e Q248);
- b) incubazione del DNA amplificato con un enzima di restrizione in grado di riconoscere il sito di restrizione alterato (creato o distrutto) dalla mutazione;
- c) analisi della dimensione dei prodotti della digestione ed opzionalmente confronto con il profilo di restrizione generato da un donatore sano;

in cui l'avvenuta o la mancata digestione su almeno una copia cromosomica è indice della presenza nel DNA del soggetto campione di almeno una delle mutazioni responsabili di emocromatosi ereditaria non-HFE.

L'analisi della dimensione dei prodotti della digestione viene effettuata,

ad esempio, tramite gel elettroforesi, utilizzando un marcatore di pesi molecolari, seguita da visualizzazione delle bande di DNA, tramite ad esempio di etidio bromuro.

Come verrà illustrato in dettaglio negli esempi sperimentali che descrivono una delle realizzazioni preferite del metodo di diagnosi dell'invenzione, il polimorfismo del nucleotide in posizione 238 (G A) che determina la comparsa nella proteina corrispondente della sostituzione G80S determina anche la comparsa del sito di riconoscimento per l'enzima TspR1: il frammento di 421 bp amplificato con i primer di sequenza IDN 13 e 14 (esone 3), è digerito solo in presenza del polimorfismo, in due bande di 238 e 183 paia di basi, mentre rimane inalterato nel wild type.

La presenza del polimorfismo del nucleotide 521 (A T) che determina la sostituzione N174I nella proteina corrispondente, è rivelata dopo amplificazione del DNA genomico con la coppia di primers corrispondenti all'esone 6 (seq IDN19 e 20), mediante digestione con BsmI. Il polimorfismo determina la perdita della sequenza di riconoscimento per il sito di restrizione e pertanto dopo amplificazione del DNA e digestione si evidenzia la presenza del frammento intero di 425 bp: nel soggetto normale (wild type) invece, l'amplificato viene invece digerito in due frammenti di 342 e 83 bp.

La presenza del polimorfismo G T in posizione 744 di seq IDN1, che determina la sostituzione Q248H nella proteina corrispondente, è evidenziabile dopo amplificazione della regione esonica di 425 bp con la coppia di primers di seq IDN 19 e 20 (esone 6), mediante digestione con

PvuII: sequenza mutata abolisce il sito di restrizione dell'enzima e si ha quindi la comparsa di una banda di 425 bp, mentre la presenza dell'allele wild type è evidenziabile grazie alla presenza di una banda di 302 e di una di 123 bp.

I suddetti polimorfismi possono essere rivelati utilizzando perdita o l'acquisizione dei siti di restrizione sopra citati individuando anche sul cDNA primers opportuni per l'amplificazione.

Secondo una ulteriore applicazione preferita l'individuazione della mutazione secondo l'invenzione viene eseguita tramite tecniche di ibridazione in cui sono utilizzati frammenti dell'acido nucleico dell'invenzione o oligonucleotidi specifici per la mutazione secondo l'invenzione. Detti frammenti o oligonucleotidi sono in grado di ibridare in modo specifico ad una sequenza dell'acido nucleico dell'invenzione comprendente il codone mutato anche quando detta sequenza è presente insieme a numerose altre sequenze.

L'esperto del ramo è in grado di selezionare di volta in volta le condizioni di ibridazione e la lunghezza e sequenza dei frammenti o degli oligonucleotidi più adatte alla particolare tecnica di ibridazione utilizzata e al tipo di DNA che si sta analizzando (DNA genomico o complementare, amplificato o clonato in vettori opportuni).

Il metodo per rivelare i polimorfismi descritti nell'invenzione è di utilità diagnostica per rivelare la base genetica di una alterata omeostasi del ferro dove tale alterata omeostasi del ferro può portare sia ad anemia che ad iperferritinemia. In particolare il polimorfismo Q248H è di utilità diagnostica per rivelare la base genetica della patologia identificata



come siderosi africana o bantu, o di una semplice anemia.

Secondo una ulteriore realizzazione preferita, il metodo diagnostico prevede l'utilizzo di una PCR allele-specifica, in cui il DNA genomico o complementare viene sottoposto ad una reazione di PCR in cui sono utilizzati oligonucleotidi in grado di amplificare in modo selettivo un segmento di detto DNA comprendente il codone mutato e non il corrispondente segmento comprendente il codone non mutato.

In una sua realizzazione particolarmente preferita gli oligonucleotidi dell'invenzione, utilizzati per rivelare la presenza di almeno uno dei polimorfismi descritti nell'invenzione, sono chimicamente legati ad un supporto solido preferibilmente di vetro o su microchip (bidimensionale o sferico quale il "bead"), sono "computer readable", sono preferibilmente organizzati a matrice (array) e sono caratterizzati dal fatto di comprendere almeno uno dei polimorfismi dell'invenzione o almeno uno degli oligonucleotidi o dei polinucleotidi dell'invenzione.

La presente invenzione comprende inoltre kit diagnostici per la diagnosi della base genetica responsabile di una alterata omeostasi del ferro dovuta ai polimorfismi su indicati, associata o meno ad iperferritinemica o ad anemia basati sull'analisi molecolare del DNA. Tali kit sono caratterizzati dal fatto di comprendere almeno uno degli oligonucleotidi o polinucleotidi dell'invenzione, rivelando i polimorfismi oggetto della presente invenzione. Secondo una applicazione particolarmente preferita detti kit diagnostici comprendono la coppia di oligonucleotidi per l'amplificazione dell'esone 3 (seq IDN13 e 14) e la coppia di oligonucleotidi per l'amplificazione dell'esone 6 (seq IDN19 e 20), e gli

enzimi TspR1, BsmI e PvuII. Alternativamente tali kit comprendono inoltre polinucleotidi comprendenti gli oligonucleotidi di sequenza IDN 25 26 o 27. Inoltre tali kit possono comprendere opzionalmente anche oligonucleotidi e l'enzima di restrizione per rivelare la mutazione A77D determinata dal polimorfismo descritto nella domanda di brevetto WO 02/33119.

La presente invenzione si riferisce inoltre ad un metodo per la diagnosi *in vitro* dell'emocromatosi ereditaria in un mammifero comprendente la verifica della presenza in un campione biologico di detto mammifero di una proteina ferroportina 1 mutata secondo l'invenzione, in cui l'identificazione di detta proteina è una indicazione che l'individuo è affetto da emocromatosi ereditaria.

Preferibilmente detta verifica viene eseguita attraverso saggi immunologici in cui sono utilizzati anticorpi monoclonali o policlonali in grado di discriminare tra una molecola di ferroportina mutata secondo l'invenzione e una molecola di ferroportina *wild-type*.

Pertanto la presente invenzione si riferisce anche ad anticorpi, monoclonali o policlonali, in grado di riconoscere in modo specifico una molecola di ferroportina 1 mutata secondo l'invenzione o un peptide o un epitopo di essa comprendente la mutazione. Tali anticorpi sono ottenuti attraverso metodi ben noti nell'arte quali, ad esempio, quelli descritti da Harlow e Lane in *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory 1988.

Gli anticorpi dell'invenzione presentano particolare utilità, oltre che come reagenti diagnostici, per studiare le caratteristiche della proteina o a

scopi terapeutici. Ad esempio, detti anticorpi possono essere utilizzati per individuare la precisa localizzazione tissutale o cellulare della proteina mutata, studiarne le caratteristiche biochimiche o purificarla per immunoaffinità.

Sono quindi compresi nell'ambito della presente invenzione, kit per lo studio delle funzioni dei mutanti di ferroportina, basati sul riconoscimento immunospecifico di forme di ferroportina mutate, preferibilmente comprendenti anticorpi specifici per le mutazioni G80S, N174I, Q248H ed opzionalmente standard costituiti da peptidi o dalle proteine mutate espresse in forma ricombinante ed opzionalmente peptidi in grado di competere con il ligando, per la messa a punto di saggi ELISA o western Blot, oppure di radioimmunoprecipitazione in fase liquida o solida.

PARTE SPERIMENTALE

ESEMPIO 1. Identificazione delle mutazioni nel gene della ferroportina.

DNA genomico dei soggetti indice, dei familiari e dei controlli è stato estratto da leucociti ottenuti da campioni di sangue utilizzando un kit per l'estrazione di DNA dal sangue (Quiagen).

Il DNA ottenuto è stato quindi amplificato tramite PCR utilizzando coppie di primers che amplificassero l'intera regione codificante, comprese le zone di confine tra esone-introne, della ferroportina.

Sono state impiegate le seguenti coppie di primers:

Esone 1: Fw.1: 5'-GGTGCTATCTCCAGTTCCTT-3' (IDN 9)
Rv.1: 5'-GTTCAÇAGCAGAGCCACATT-3' (IDN 10)

- Esone 2: Fw.2: 5'-CAGCTCATTAAGTGACTACCATCGC-3' (IDN 11)
Rv.2: 5'-GGCTTAATACAACCTGGCTAGAACG-3' (IDN 12)
- Esone 3: Fw.3: 5'-CATAATGTAGCCAGGAAGTGCCC-3' (IDN 13)
Rv.3: 5'-TCCAGAGGTGGTGCCATCTAAG-3' (IDN 14)
- Esone 4: Fw.4: 5'-GAGACATTTTGATGTAATGTACAC-3' (IDN 15)
Rv.4: 5'-CTACCAGATATTCAATTTTCTGCC-3' (IDN 16)
- Esone 5: Fw.5: 5'-CCACCAAAGACTATTTTAAACTGC-3' (IDN 17)
Rv.5: 5'-TCACCACCGATTAAAGTGAATCC-3' (IDN 18)
- Esone 6: Fw.6: 5'-GTATTGTGTAAATGGGCAGTCTC-3' (IDN 19)
Rv.6: 5'-CCCCACTGGTAATAAACCTG-3' (IDN 20)
- Esone 7: Fw.7: 5'-GGCTTTTATTTCTACATGTCCTCC-3' (IDN 21)
Rv.7: 5'-ACATTTAGGGAACATTTTCAGATC-3' (IDN 22)
- Esone 8: Fw.8: 5'-AAGGTGACTTAAAGACAGTCAGGC-3' (IDN 23)
Rv.8: 5'-GCTGACTTAGGTTTCCTAACAGC-3' (IDN 24)

L'amplificazione delle regioni corrispondenti a ciascun esone è stata effettuata come segue: 200 ng di DNA genomico sono stati amplificati in 50 µl finali di tampone di reazione 1X contenente dNTP 200 µM, MgCl₂ 1.5 mM, 25 picomoli di ciascuno dei sopra descritti oligonucleotide, 1 unità di enzima di Taq polimerasi (Applied Biosystems). Per la reazione di amplificazione è stato utilizzato un programma di 30 cicli, ognuno dei quali era caratterizzato dal seguente profilo termico:

94°C per 1 minuto,

58°C per 40 secondi,

75°C per 5 minuti.

I frammenti ottenuti sono stati purificati e sequenziati mediante

sequenziamento automatico con Sequenziatore Beckman Coulter.

L'analisi della sequenza ha portato alla identificazione nell'esone 3 della mutazione G80S e nell'esone 6 delle mutazioni N174I e Q248H rispetto alla sequenza wild type (GenBank numero di accesso: AF231121), che non fu invece rilevata in nessuno dei soggetti controllo.

Un'ulteriore verifica delle mutazioni fu ottenuta digerendo un'aliquota dello stesso prodotto di PCR iniziale con endonucleasi il cui sito di restrizione è modificato dal cambio nucleotidico.

In particolare la mutazione Q248H fu verificata digerendo, in accordo con le condizioni suggerite dalla ditta produttrice (New England BioLabs), il prodotto iniziale di PCR con l'enzima *PvuII*, che taglia tra GC nella sequenza 5' CAGCTG 3'. Il cambio di base G→T nella sequenza mutata abolisce il sito di restrizione dell'enzima.

Esempio 2. Caratterizzazione del quadro clinico dei soggetti recanti la mutazione Q248H.

Fu valutato il quadro clinico di soggetti africani normali o affetti da siderosi Bantu (legata cioè all'accumulo eccessivo di birra preparata in recipienti di ferro) in cui era presente la mutazione Q248H. In tali soggetti la mutazione correla con una iperferritinemia più elevata che in soggetti che non hanno la mutazione ma consumano livelli simili di alcool. Paradossalmente, la presenza della mutazione determina anche una condizione di anemia, con calo altamente significativo dell'emoglobina.

Quindi la mutazione ha un effetto aggravante su una condizione preesistente di eccesso di ferro.

Nei pazienti di colore americani affetti da uno stato portatore di



talassemia, la mutazione provoca un fenotipo più grave, con iperferritinemia e deposito di ferro nelle cellule reticoloendoteliali (macrofagiche) del midollo e del fegato pur senza che i pazienti abbiano subito trasfusioni di sangue (pratica che può portare ad accumulo di ferro nelle cellule macrofagiche).

Iperferritinemia ed accumulo di ferro nelle cellule reticolendoteliali corrispondono al quadro clinico osservato dagli stessi autori della presente invenzione in Pietrangelo et al., 1999, N. Engl. J. Med, 3341: 725-732.

La mutazione è inoltre un marcatore della popolazione nera di origine africana: essa è risultata infatti assente in un campione costituito da 300 donatori sani bianchi caucasici.

Nella popolazione africana furono testati 100 cromosomi di soggetti africani apparentemente normali e 6 di questi cromosomi presentavano la mutazione. Parallelamente, la mutazione fu ritrovata in 4 soggetti su 100 di un campione di donatori americani di colore.

L'analisi di questi soggetti apparentemente sani ha mostrato una tendenza dei livelli di ferritinemia a valori più elevati ed una emoglobinemia significativamente più bassa rispetto a quelli senza mutazione. La mutazione quindi non è in grado di provocare una malattia, ma provoca un fenotipo più severo in associazione ad altri fattori (ad es. consumo alcolico, talassemia). Inoltre, nella popolazione nera africana ed americana potrebbe contribuire a determinare i livelli di emoglobina tendenzialmente più bassi, e di ferritinemia tendenzialmente più alti. Queste conclusioni emergono anche dalla lettura della Tabella 1

presentate nella parte sperimentale in cui sono riportati di dati di ferritinemia ed emoglobina dei pazienti con la mutazione nelle famiglie africane, in quella americana e nella popolazione di colore apparentemente sana.

Tabella 1. Valutazione dell'assetto marziale e dell'emoglobina in relazione alla mutazione Q248H della ferroportina in Africani e Afroamericani. I membri delle famiglie provengono da tre pedigree africani ed uno afroamericano. La numerosità del gruppo è indicata sotto ogni parametro (N=).

| | Ferroportina mutazione Q248H (N = 10) | Ferroportina normale (N = 11) | p |
|---|---|-------------------------------------|---------|
| Membri delle famiglie (esclusi i casi affetti) | | | |
| Ferritina (microg/L; media geometrica e SE range) | 76(47-125) | 95(62-147) | 0.748 |
| Ferritina/AST ratio* (microg/U; media \pm SE) | 14.7 \pm 4.6 | 5.5 \pm 4.1 | 0.171 |
| Saturazione della Transferrina media \pm SE) | 36 \pm 7 | 22 \pm 8 | 0.258 |
| Emoglobina*** (g/dL; media \pm SE) | 11.8 \pm 0.6 | 13.3 \pm 0.5 | 0.088 |
| Africani normali | (N = 7) | (N = 44) | |
| Ferritina (microg/L; media geometrica e SE range) | 61(38-97) | 34(28-40) | 0.251 |
| Saturazione della Transferrina (%; media \pm SE) | 28 \pm 5 | 26 \pm 2 | 0.684 |
| Emoglobina (g/dL; media SE) | 12.5 \pm 0.5 | 13.7 \pm 0.2 | 0.039 |
| Membri delle famiglie e controlli combinati | (N = 17) | (N = 55) | |
| Ferritina/AST ratio (microg/U; media e SE range) | 61(44-82) | 44(37-51) | 0.358 |
| Transferrin saturation media \pm SE) | 30 \pm 4 | 26 \pm 2 | 0.357 |
| Emoglobina (g/dL; media \pm SE) | 12.1 \pm 0.4 | 13.6 \pm 0.2 | <0.0005 |

Il confronto statistico è stato effettuato mediante il test ANOVA aggiustando per età, sesso e, per gli africani, consumo di birra. Nello studio pilota di screening per la mutazione Q248H sono stati inclusi i familiari dei pazienti con sovraccarico di ferro (n. 21) e soggetti africani

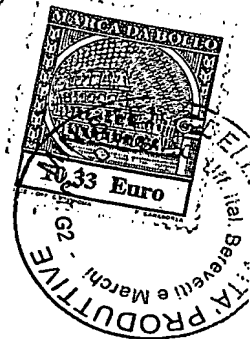
con parametri normali del metabolismo del ferro. Si nota come, anche in queste popolazioni «normali», la presenza della mutazione Q248H si associ ad una tendenza a ferritinemia più elevata e soprattutto ad un significativo calo dell'emoglobina.

ESEMPIO 3. Messa a punto del metodo diagnostico mediante PCR.

Dal sequenziamento delle regioni esoniche amplificate come descritto nell'esempio 1, risultò che il polimorfismo del nucleotide 238 della sequenza IDN1, consistente nella sostituzione di una guanina con una adenosina (G A) responsabile della sostituzione della glicina in posizione 80 della seq IDN2 con serina (G80S) nella rispettiva proteina codificata, determina la comparsa di un sito di restrizione per l'enzima TspR1. La sequenza dell'intero cDNA codificante per la forma mutata di ferroportina in posizione 80 (G80S) è riportato nell'Allegato sequenze come sequenza IDN3.

In figura 1B è mostrato il profilo di restrizione del DNA genomico amplificato da ciascun individuo: nel caso di soggetti sani, che presentano solo la sequenza *wild type*, in seguito a digestione con TspR1 il frammento DNA amplificato con la coppia di oligonucleotidi 13 e 14, di 421 paia di basi, non viene digerito. Nei soggetti affetti dalla patologia, eterozigoti per la mutazione, il DNA amplificato viene digerito in una banda di 421 paia di basi (allele normale) e in due bande di 238 e 183 paia di basi (quest'ultima non visibile in Figura 1b).

Il polimorfismo del nucleotide 521 della sequenza IDN1, consistente nella sostituzione di una adenina con una timina (A T), responsabile della sostituzione dell'aminoacido 174 asparagina con isoleucina (N174I)



nella rispettiva proteina codificata, determina invece abolizione della sequenza di riconoscimento per l'enzima di restrizione BsmI e quindi il frammento di DNA del 6° esone, amplificato da soggetti portatori del polimorfismo con la coppia di oligonucleotidi 19 e 20, non viene digerito.

La sequenza dell'intero cDNA codificante per la forma mutata di ferroportina in posizione 174 (N174I) è riportato nell'Allegato sequenze come sequenza IDN5.

In figura 2 pannello B, è rappresentato il profilo di restrizione ottenuto in seguito a digestione con BsmI del DNA amplificato da individui sani e portatori del polimorfismo. Nel caso di soggetti sani che presentano solo la sequenza *wild type* in seguito a digestione con BsmI del frammento di DNA amplificato con la coppia di primer 19 e 20, di 425 paia di basi, viene digerito in due frammenti di 342 e 83 paia di basi. Nei soggetti portatori della patologia, eterozigoti per la mutazione, in seguito a digestione con BsmI si ottengono tre bande: una banda di 425 paia di basi (allele mutato) e due bande di 342 e 83 paia di basi (allele *wild-type*).

Il polimorfismo del nucleotide 744 della sequenza IDN1, consistente nella sostituzione di una guanina con timina (G T), determina la sostituzione dell'aminoacido 248 (glutamina) con istidina (Q248H) nella rispettiva proteina codificata e l'abolizione del sito di riconoscimento per l'enzima PvuII. La sequenza dell'intero cDNA codificante per la forma mutata di ferroportina in posizione 248 (Q248H) è riportato nell'Allegato sequenze come sequenza IDN7.

In figura 3B è riportato il profilo di restrizione ottenuto in seguito a

digestione con PvuII del DNA amplificato da individui sani o portatori del polimorfismo: nel caso di soggetti sani che presentano solo la sequenza *wild type*, il DNA amplificato di 425 paia di basi, viene digerito con l'enzima di restrizione PvuII. Nei soggetti eterozigoti, portatori della patologia, un allele viene digerito e l'altro no così che si ottengono tre bande: una banda di 425 paia di basi (allele mutato) e due bande di 302 e 123 paia di basi (allele wild-type).

RIVENDICAZIONI

1. Polinucleotide isolato codificante una ferroportina 1 mutata in uno dei seguenti aminoacidi:
 - amminoacido in posizione 80 della seq IDN2,
 - amminoacido in posizione 174 della seq IDN2,
 - amminoacido in posizione 248 della seq IDN2,rispetto alla sequenza wild type.
2. Polinucleotide secondo la rivendicazione 1 caratterizzato dal fatto che l'amminoacido in posizione 80 è diverso da glicina.
3. Polinucleotide secondo la rivendicazione 2 caratterizzato dal fatto di presentare un polimorfismo al nucleotide 238 della sequenza IDN1.
4. Polinucleotide secondo la rivendicazione 3 caratterizzato dal fatto che detto polimorfismo è una sostituzione di una G con una A.
5. Polinucleotide secondo la rivendicazione 1 caratterizzato dal fatto che tale amminoacido in posizione 174 è diverso da asparagina.
6. Polinucleotide secondo la rivendicazione 5 caratterizzato dal fatto di presentare un polimorfismo al nucleotide 521 della sequenza IDN1.
7. Polinucleotide secondo la rivendicazione 6 caratterizzato dal fatto che detto polimorfismo è una sostituzione di una A con una T.
8. Polinucleotide secondo la rivendicazione 1 caratterizzato dal fatto che tale amminoacido in posizione 248 è diverso da glutammina.
9. Polinucleotide secondo la rivendicazione 8 caratterizzato dal fatto di presentare un polimorfismo al nucleotide 744 della sequenza IDN1.
10. Polinucleotide secondo la rivendicazione 9 caratterizzato dal fatto che detto polimorfismo è una sostituzione di una G con una T.



11. Polinucleotide secondo le rivendicazioni 1-10 caratterizzato dal fatto di essere DNA genomico.
12. Polinucleotide secondo le rivendicazioni 1-10 caratterizzato dal fatto di essere mRNA.
13. Polinucleotide secondo le rivendicazioni 1-10 caratterizzato dal fatto di essere cDNA.
14. Polinucleotidi codificanti per una ferroportina mutata secondo la rivendicazione 1 caratterizzati da una sequenza nucleotidica corrispondente alla seqIDN3 o alla seqIDN 5 o alla seqIDN7.
15. Polinucleotide di almeno 10 nucleotidi consecutivi derivato dalla sequenza IDN3 5 o 7 e caratterizzato dal fatto di comprendere almeno uno dei nucleotidi polimorfici rispettivamente scelti tra: polimorfismo corrispondente alla posizione 238 della seqIDN3, polimorfismo corrispondente alla posizione 521 della seqIDN5 o polimorfismo corrispondente alla posizione 744 della seqIDN7.
16. Polinucleotidi secondo la rivendicazione 15 caratterizzati dal fatto di comprendere almeno uno degli oligonucleotidi di sequenza corrispondente alle sequenze IDN9-27.
17. Polinucleotidi avente sequenza complementare rispetto ai polinucleotidi secondo le rivendicazioni 14-16.
18. Polinucleotide secondo le rivendicazioni 1-16 caratterizzato dal fatto di essere marcato.
19. Vettore ricombinante caratterizzato dal fatto di comprendere il polinucleotide secondo le rivendicazioni 1-17.
20. Cellula isolata caratterizzata dal fatto di essere transfettata o

- trasformata con il vettore ricombinante secondo la rivendicazione 19.
20. Cellula eucariota, tessuto o animale non umano comprendente un transgene dove tale transgene è almeno un polinucleotide secondo la rivendicazioni 1-16.
21. Ferroportina 1 mutata codificata dai polinucleotidi secondo le rivendicazioni 1-16.
22. Ferroportina mutata secondo la rivendicazione 21 avente sequenza amminoacidica corrispondente ad almeno una delle sequenza IDN4, 6, 8 o loro frammenti.
23. Peptide avente una lunghezza di almeno 6 aminoacidi ed una sequenza parziale derivata da almeno una delle sequenza scelte tra: seq IDN4, 6 o 8 e caratterizzato dal fatto di comprendere almeno uno degli amminoacidi mutati in posizione corrispondente alle posizioni 80, 174 o 248 di SEQ ID NO: 2.
24. Polinucleotidi secondo le rivendicazioni 1-17 per uso terapeutico.
25. Peptidi secondo la rivendicazione 23 per uso terapeutico.
26. Ferroportina 1 mutata secondo la rivendicazione 22 per uso terapeutico.
27. Metodo per rivelare polimorfismi nel gene della ferroportina caratterizzato dal fatto di utilizzare almeno uno dei polinucleotidi secondo le rivendicazioni 1-18.
28. Metodo secondo la rivendicazione 24 dove tali polimorfismi sono inoltre associati a iperferritinemia o anemia.
29. Metodo per la diagnosi *in vitro* di emocromatosi ereditaria non legata al gene HFE in un mammifero comprendente i seguenti passaggi:

- a) isolamento di DNA genomico o RNA da un campione biologico ottenuto da un mammifero;
- b) verifica della presenza in detto DNA genomico o RNA di almeno uno dei polimorfismi secondo le rivendicazioni 4, 7, 10, in cui la presenza di almeno una di detti polimorfismi è una indicazione che detto mammifero è affetto da emocromatosi ereditaria non HFE o è predisposto allo sviluppo di tale patologia.

27. Metodo per la diagnosi *in vitro* di una alterata omeostasi del ferro su base genetica che consiste essenzialmente nella verifica della presenza in un campione di DNA genomico o di RNA o di cDNA di almeno uno dei polimorfismi scelti tra: polimorfismo corrispondente alla posizione 238 della seqIDN3, polimorfismo corrispondente alla posizione 521 della seqIDN5 o polimorfismo corrispondente alla posizione 744 della seqIDN7.

28. Metodo secondo la rivendicazione 27 dove tale alterata omeostasi del ferro è anemia o iperferritinemia, siderosi africana o bantu, o emocromatosi ereditaria non HFE.

29. Metodo secondo la rivendicazione 28 per la diagnosi *in vitro* della siderosi africana o emocromatosi bantu in un mammifero comprendente i seguenti stadi:

- a) isolamento di DNA genomico o RNA da un campione biologico ottenuto da detto mammifero;
- b) verifica della presenza in detto DNA genomico o RNA della presenza di un polimorfismo del nucleotide corrispondente al nucleotide 744 di seqIDN1,

in cui la presenza di detto polimorfismo è una indicazione che detto mammifero è affetto da siderosi africana o emocromatosi Bantu o è predisposto allo sviluppo di tale patologia.

30. Metodo secondo le rivendicazioni 25-28 caratterizzato dal fatto che prima di detta verifica l'RNA viene trascritto in cDNA mediante retrotrascrittasi inversa.
31. Metodo secondo le rivendicazioni 26-30 dove detta verifica viene effettuata dopo amplificazione mediante PCR con una coppia di oligonucleotidi adatti, di un frammento di DNA comprendente almeno uno dei seguenti nucleotidi polimorfici: nucleotide corrispondente alla posizione 238, nucleotide corrispondente alla posizione 521, nucleotide corrispondente alla posizione 744 di SEQ ID NO: 1.
32. Metodo secondo la rivendicazione 31 caratterizzato dal fatto che per detta amplificazione è utilizzato almeno uno dei seguenti oligonucleotidi: IDN 13, 14, 19 e 20.
33. Metodo secondo le rivendicazioni 26-32 caratterizzato dal fatto che detto mammifero è Homo sapiens.
34. Metodo secondo le rivendicazioni 25 e 28 caratterizzato dal fatto che detto campione biologico è un campione di sangue, plasma, saliva, urina, feci, liquido amniotico o tessuto.
35. Metodo secondo le rivendicazioni 25-34 caratterizzato dal fatto che detta verifica viene eseguita utilizzando una tecnica scelta nel gruppo consistente di: acquisizione o perdita di un sito di riconoscimento per un enzima di restrizione, tecniche di ibridazione con sonde oligonucleotidiche allele-specifiche secondo le

rivendicazioni 15-17, PCR allele-specifica, mismatch repair detection, single-strand conformational polymorphism analysis, gel elettroforesi in gradiente denaturante, Hot Cleavage, DNase e RNase protection assay, allele specific primer extension, genetic bit analysis oligonucleotide-ligation assay, allele specific ligation chain reaction e tecniche di sequenziamento.



36. Metodo secondo la rivendicazione 35 caratterizzato dal fatto che detta verifica viene eseguita tramite tecniche basate sull'utilizzo di enzimi di restrizione, PCR allele specifica, tecniche di ibridazione o di sequenziamento.
37. Metodo secondo la rivendicazione 36 dove detti enzimi di restrizione sono scelti tra: TspR1, BsmI, PvuII.
38. Metodo per la diagnosi *in vitro* di emocromatosi ereditaria in un mammifero comprendente la verifica della presenza in un campione biologico ottenuto da detto mammifero di una proteina ferroportina 1 mutata secondo la rivendicazione 21, in cui la presenza di detta proteina è una indicazione che detto mammifero è affetto da emocromatosi ereditaria.
39. Metodo secondo la rivendicazione 38 in cui detta identificazione viene eseguita utilizzando anticorpi in grado di riconoscere in modo specifico detta ferroportina 1 mutata.
40. Anticorpi monoclonali o policlonali in grado di riconoscere in modo specifico una proteina ferroportina 1 mutata secondo le rivendicazioni 21-22.
41. Uso degli anticorpi secondo la rivendicazione 40 per l'inattivazione

specifica di una proteina ferroportina 1 mutata in accordo con la rivendicazione 21.

42. Supporto "computer readable" caratterizzato dal fatto di comprendere almeno dei polinucleotidi in accordo con le rivendicazioni 1-17.
43. Uso dei polinucleotidi secondo le rivendicazioni 1-17 per la rivelazione di polimorfismi nel gene della ferroportina.
44. Uso dei polinucleotidi secondo le rivendicazioni 1-17 per la preparazione di un medicamento per la cura di patologie caratterizzate da una alterata omeostasi del ferro.
45. Uso dei polinucleotidi secondo le rivendicazioni 1-17 per modulare l'espressione del gene codificante per una ferroportina 1 mutata.
46. Kit per la diagnosi di emocromatosi ereditaria non HFE dipendente comprendente almeno uno degli oligonucleotidi secondo le rivendicazioni 1-17.
47. Kit per la diagnosi della base genetica di una alterata omeostasi del ferro comprendente almeno uno dei polinucleotidi secondo le rivendicazioni 1-17.
48. Kit per la diagnosi dei polimorfismi di almeno uno dei polimorfismi scelti tra: polimorfismo del nucleotide corrispondente alla posizione 238, polimorfismo del nucleotide corrispondente alla posizione 521, polimorfismo del nucleotide corrispondente alla posizione 744 di SEQ ID NO: 1 caratterizzato dal fatto di comprendere almeno uno degli oligonucleotidi di sequenza: IDN13, 14, 19, 20 in combinazione con almeno una tra i seguenti enzimi di restrizione: TspR1, BsmI, PvuII.

3946PTIT.

Notarbartolo & Gervasi S.p.A.

(SM/pd)

Milano, li 9 Giugno 2003

p. PIETRANGELO ANTONELLO

il Mandatario

one

[Signature]
Dr.ssa Gemma Gervasi

NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.

LISTATO SEQUENZE

<110> Pietrangelo, Antonello

<120> Mutazioni nel gene della ferroportina associate ad emocromatosi ereditaria

<130> 3946

<160> 27

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1716

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

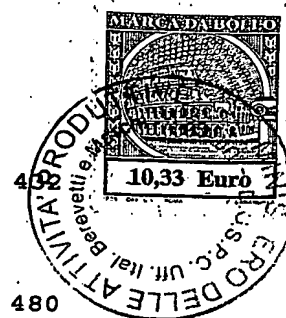
<222> (1)..(1716)

<223> cDNA codificante per la ferroportina wild type . Polimorfismi relativi ai codoni:
238-240 (G80), 520-522 (N174), 742-744 (Q248)

<400> 1

| | |
|---|-----|
| atg acc agg gcg gga gat cac aac cgc cag aga gga tgc tgt gga tcc | 48 |
| Met Thr Arg Ala Gly Asp His Asn Arg Gln Arg Gly Cys Cys Gly Ser | |
| 1 5 10 15 | |
| ttg gcc gac tac ctg acc tct gca aaa ttc ctt ctc tac ctt ggt cat | 96 |
| Leu Ala Asp Tyr Leu Thr Ser Ala Lys Phe Leu Leu Tyr Leu Gly His | |
| 20 25 30 | |
| tct ctc tct act tgg gga gat cgg atg tgg cac ttt gcg gtg tct gtg | 144 |
| Ser Leu Ser Thr Trp Gly Asp Arg Met Trp His Phe Ala Val Ser Val | |
| 35 40 45 | |
| ttt ctg gta gag ctc tat gga aac agc ctc ctt ttg aca gca gtc tac | 192 |
| Phe Leu Val Glu Leu Tyr Gly Asn Ser Leu Leu Leu Thr Ala Val Tyr | |
| 50 55 60 | |
| ggg ctg gtg gtg gca ggg tct gtt ctg gtc ctg gga gcc atc atc ggt | 240 |
| Gly Leu Val Val Ala Gly Ser Val Leu Val Leu Gly Ala Ile Ile Gly | |
| 65 70 75 80 | |
| gac tgg gtg gac aag aat gct aga ctt aaa gtg gcc cag acc tcg ctg | 288 |
| Asp Trp Val Asp Lys Asn Ala Arg Leu Lys Val Ala Gln Thr Ser Leu | |
| 85 90 95 | |
| gtg gta cag aat gtt tca gtc atc ctg tgt gga atc atc ctg atg atg | 336 |
| Val Val Gln Asn Val Ser Val Ile Leu Cys Gly Ile Ile Leu Met Met | |
| 100 105 110 | |
| gtt ttc tta cat aaa cat gag ctt ctg acc atg tac cat gga tgg gtt | 384 |

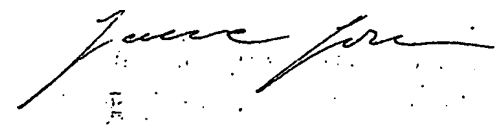
Janice



| | |
|---|------|
| Val Phe Leu His Lys His Glu Leu Leu Thr Met Tyr His Gly Trp Val | |
| 115 120 125 | |
| ctc act tcc tgc tat atc ctg atc atc act att gca aat att gca aat | |
| Leu Thr Ser Cys Tyr Ile Leu Ile Ile Thr Ile Ala Asn Ile Ala Asn | |
| 130 135 140 | |
| ttg gcc agt act gct act gca atc aca atc caa agg gat tgg att gtt | |
| Leu Ala Ser Thr Ala Thr Ala Ile Thr Ile Gln Arg Asp Trp Ile Val | |
| 145 150 155 160 | |
| ggt gtt gca gga gaa gac aga agc aaa cta gca aat atg aat gcc aca | 528 |
| Val Val Ala Gly Glu Asp Arg Ser Lys Leu Ala Asn Met Asn Ala Thr | |
| 165 170 175 | |
| ata cga agg att gac cag tta acc aac atc tta gcc ccc atg gct gtt | |
| Ile Arg Arg Ile Asp Gln Leu Thr Asn Ile Leu Ala Pro Met Ala Val | 576 |
| 180 185 190 | |
| ggc cag att atg aca ttt ggc tcc cca gtc atc ggc tgt ggc ttt att | |
| Gly Gln Ile Met Thr Phe Gly Ser Pro Val Ile Gly Cys Gly Phe Ile | 624 |
| 195 200 205 | |
| tcg gga tgg aac ttg gta tcc atg tgc gtg gag tac gtc ctg ctc tgg | |
| Ser Gly Trp Asn Leu Val Ser Met Cys Val Glu Tyr Val Leu Leu Trp | 672 |
| 210 215 220 | |
| aag gtt tac cag aaa acc cca gct cta gct gtg aaa gct ggt ctt aaa | |
| Lys Val Tyr Gln Lys Thr Pro Ala Leu Ala Val Lys Ala Gly Leu Lys | 720 |
| 225 230 235 240 | |
| gaa gag gaa act gaa ttg aaa cag ctg aat tta cac aaa gat act gag | |
| Glu Glu Glu Thr Glu Leu Lys Gln Leu Asn Leu His Lys Asp Thr Glu | 768 |
| 245 250 255 | |
| cca aaa ccc ctg gag gga act cat cta atg ggt gtg aaa gac tct aac | |
| Pro Lys Pro Leu Glu Gly Thr His Leu Met Gly Val Lys Asp Ser Asn | 816 |
| 260 265 270 | |
| atc cat gag ctt gaa cat gag caa gag cct act tgt gcc tcc cag atg | |
| Ile His Glu Leu Glu His Glu Gln Glu Pro Thr Cys Ala Ser Gln Met | 864 |
| 275 280 285 | |
| gct gag ccc ttc cgt acc ttc cga gat gga tgg gtc tcc tac tac aac | |
| Ala Glu Pro Phe Arg Thr Phe Arg Asp Gly Trp Val Ser Tyr Tyr Asn | 912 |
| 290 295 300 | |
| cag cct gtg ttt ctg gct ggc atg ggt ctt gct ttc ctt tat atg act | |
| Gln Pro Val Phe Leu Ala Gly Met Gly Leu Ala Phe Leu Tyr Met Thr | 960 |
| 305 310 315 320 | |
| gtc ctg ggc ttt gac tgc atc acc aca ggg tac gcc tac act cag gga | |
| Val Leu Gly Phe Asp Cys Ile Thr Thr Gly Tyr Ala Tyr Thr Gln Gly | 1008 |
| 325 330 335 | |
| ctg agt ggt tcc atc ctc agt att ttg atg gga gca tca gct ata act | 1056 |

June June

| | |
|---|------|
| Leu Ser Gly Ser Ile Leu Ser Ile Leu Met Gly Ala Ser Ala Ile Thr 340 345 350 | |
| gga ata atg gga act gta gct ttt act tgg cta cgt cga aaa tgt ggt Gly Ile Met Gly Thr Val Ala Phe Thr Trp Leu Arg Arg Lys Cys Gly 355 360 365 | 1104 |
| ttg gtt cgg aca ggt ctg atc tca gga ttg gca cag ctt tcc tgt ttg Leu Val Arg Thr Gly Leu Ile Ser Gly Leu Ala Gln Leu Ser Cys Leu 370 375 380 | 1152 |
| atc ttg tgt gtg atc tct gta ttc atg cct gga agc ccc ctg gac ttg Ile Leu Cys Val Ile Ser Val Phe Met Pro Gly Ser Pro Leu Asp Leu 385 390 395 400 | 1200 |
| tcc gtt tct cct ttt gaa gat atc cga tca agg ttc att caa gga gag Ser Val Ser Pro Phe Glu Asp Ile Arg Ser Arg Phe Ile Gln Gly Glu 405 410 415 | 1248 |
| tca att aca cct acc aag ata cct gaa att aca act gaa ata tac atg Ser Ile Thr Pro Thr Lys Ile Pro Glu Ile Thr Thr Glu Ile Tyr Met 420 425 430 | 1296 |
| tct aat ggg tct aat tct gct aat att gtc ccg gag aca agt cct gaa Ser Asn Gly Ser Asn Ser Ala Asn Ile Val Pro Glu Thr Ser Pro Glu 435 440 445 | 1344 |
| tct gtg ccc ata atc tct gtc agt ctg ctg ttt gca ggc gtc att gct Ser Val Pro Ile Ile Ser Val Ser Leu Leu Phe Ala Gly Val Ile Ala 450 455 460 | 1392 |
| gct aga atc ggt ctt tgg tcc ttt gat tta act gtg aca cag ttg ctg Ala Arg Ile Gly Leu Trp Ser Phe Asp Leu Thr Val Thr Gln Leu Leu 465 470 475 480 | 1440 |
| caa gaa aat gta att gaa tct gaa aga ggc att ata aat ggt gta cag Gln Glu Asn Val Ile Glu Ser Glu Arg Gly Ile Ile Asn Gly Val Gln 485 490 495 | 1488 |
| aac tcc atg aac tat ctt ctt gat ctt ctg cat ttc atc atg gtc atc Asn Ser Met Asn Tyr Leu Leu Asp Leu Leu His Phe Ile Met Val Ile 500 505 510 | 1536 |
| ctg gct cca aat cct gaa gct ttt ggc ttg ctc gta ttg att tca gtc Leu Ala Pro Asn Pro Glu Ala Phe Gly Leu Leu Val Leu Ile Ser Val 515 520 525 | 1584 |
| tcc ttt gtg gca atg ggc cac att atg tat ttc cga ttt gcc caa aat Ser Phe Val Ala Met Gly His Ile Met Tyr Phe Arg Phe Ala Gln Asn 530 535 540 | 1632 |
| act ctg gga aac aag ctc ttt gct tgc ggt cct gat gca aaa gaa gtt Thr Leu Gly Asn Lys Leu Phe Ala Cys Gly Pro Asp Ala Lys Glu Val 545 550 555 560 | 1680 |
| agg aag gaa aat caa gca aat aca tct gtt gtt tga | 1716 |



Arg Lys Glu Asn Gln Ala Asn Thr Ser Val Val
565 570

<210> 2
<211> 571
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Thr Arg Ala Gly Asp His Asn Arg Gln Arg Gly Cys Cys Gly Ser
1 5 10 15

Leu Ala Asp Tyr Leu Thr Ser Ala Lys Phe Leu Leu Tyr Leu Gly His
20 25 30

Ser Leu Ser Thr Trp Gly Asp Arg Met Trp His Phe Ala Val Ser Val
35 40 45

Phe Leu Val Glu Leu Tyr Gly Asn Ser Leu Leu Leu Thr Ala Val Tyr
50 55 60

Gly Leu Val Val Ala Gly Ser Val Leu Val Leu Gly Ala Ile Ile Gly
65 70 75 80

Asp Trp Val Asp Lys Asn Ala Arg Leu Lys Val Ala Gln Thr Ser Leu
85 90 95

Val Val Gln Asn Val Ser Val Ile Leu Cys Gly Ile Ile Leu Met Met
100 105 110

Val Phe Leu His Lys His Glu Leu Leu Thr Met Tyr His Gly Trp Val
115 120 125

Leu Thr Ser Cys Tyr Ile Leu Ile Ile Thr Ile Ala Asn Ile Ala Asn
130 135 140

Leu Ala Ser Thr Ala Thr Ala Ile Thr Ile Gln Arg Asp Trp Ile Val
145 150 155 160

Val Val Ala Gly Glu Asp Arg Ser Lys Leu Ala Asn Met Asn Ala Thr
165 170 175

Ile Arg Arg Ile Asp Gln Leu Thr Asn Ile Leu Ala Pro Met Ala Val

180

185

190

Gly Gln Ile Met Thr Phe Gly Ser Pro Val Ile Gly Cys Gly Phe Ile
 195 200 205

Ser Gly Trp Asn Leu Val Ser Met Cys Val Glu Tyr Val Leu Leu Trp
 210 215 220

Lys Val Tyr Gln Lys Thr Pro Ala Leu Ala Val Lys Ala Gly Leu Lys
 225 230 235 240

Glu Glu Glu Thr Glu Leu Lys Gln Leu Asn Leu His Lys Asp Thr Glu
 245 250 255

Pro Lys Pro Leu Glu Gly Thr His Leu Met Gly Val Lys Asp Ser Asn
 260 265 270

Ile His Glu Leu Glu His Glu Gln Glu Pro Thr Cys Ala Ser Gln Met
 275 280 285

Ala Glu Pro Phe Arg Thr Phe Arg Asp Gly Trp Val Ser Tyr Tyr Asn
 290 295 300

Gln Pro Val Phe Leu Ala Gly Met Gly Leu Ala Phe Leu Tyr Met Thr
 305 310 315 320

Val Leu Gly Phe Asp Cys Ile Thr Thr Gly Tyr Ala Tyr Thr Gln Gly
 325 330 335

Leu Ser Gly Ser Ile Leu Ser Ile Leu Met Gly Ala Ser Ala Ile Thr
 340 345 350

Gly Ile Met Gly Thr Val Ala Phe Thr Trp Leu Arg Arg Lys Cys Gly
 355 360 365

Leu Val Arg Thr Gly Leu Ile Ser Gly Leu Ala Gln Leu Ser Cys Leu
 370 375 380

Ile Leu Cys Val Ile Ser Val Phe Met Pro Gly Ser Pro Leu Asp Leu
 385 390 395 400

Ser Val Ser Pro Phe Glu Asp Ile Arg Ser Arg Phe Ile Gln Gly Glu

James

405

410

415

Ser Ile Thr Pro Thr Lys Ile Pro Glu Ile Thr Thr Glu Ile Tyr Met
 420 425 430

Ser Asn Gly Ser Asn Ser Ala Asn Ile Val Pro Glu Thr Ser Pro Glu
 435 440 445

Ser Val Pro Ile Ile Ser Val Ser Leu Leu Phe Ala Gly Val Ile Ala
 450 455 460

Ala Arg Ile Gly Leu Trp Ser Phe Asp Leu Thr Val Thr Gln Leu Leu
 465 470 475 480

Gln Glu Asn Val Ile Glu Ser Glu Arg Gly Ile Ile Asn Gly Val Gln
 485 490 495

Asn Ser Met Asn Tyr Leu Leu Asp Leu Leu His Phe Ile Met Val Ile
 500 505 510

Leu Ala Pro Asn Pro Glu Ala Phe Gly Leu Leu Val Leu Ile Ser Val
 515 520 525

Ser Phe Val Ala Met Gly His Ile Met Tyr Phe Arg Phe Ala Gln Asn
 530 535 540

Thr Leu Gly Asn Lys Leu Phe Ala Cys Gly Pro Asp Ala Lys Glu Val
 545 550 555 560

Arg Lys Glu Asn Gln Ala Asn Thr Ser Val Val
 565 570

<210> 3

<211> 1716

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1716)

<223> cDNA codificante per una ferroportina mutata in posizione (G80).

<400> 3

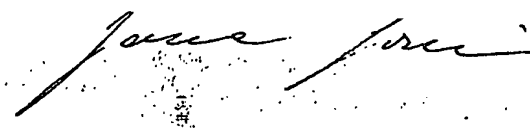
atg acc agg gcg gga gat cac aac cgc cag aga gga tgc tgt gga tcc

48



| | |
|---|-----|
| Met Thr Arg Ala Gly Asp His Asn Arg Gln Arg Gly Cys Cys Gly Ser | |
| 1 5 10 15 | |
| ttg gcc gac tac ctg acc tct gca aaa ttc ctt ctc tac ctt ggt cat | 96 |
| Leu Ala Asp Tyr Leu Thr Ser Ala Lys Phe Leu Leu Tyr Leu Gly His | |
| 20 25 30 | |
| tct ctc tct act tgg gga gat cgg atg tgg cac ttt gcg gtg tct gtg | 144 |
| Ser Leu Ser Thr Trp Gly Asp Arg Met Trp His Phe Ala Val Ser Val | |
| 35 40 45 | |
| ttt ctg gta gag ctc tat gga aac agc ctc ctt ttg aca gca gtc tac | 192 |
| Phe Leu Val Glu Leu Tyr Gly Asn Ser Leu Leu Leu Thr Ala Val Tyr | |
| 50 55 60 | |
| ggg ctg gtg gtg gca ggg tct gtt ctg gtc ctg gga gcc atc atc agt | 240 |
| Gly Leu Val Val Ala Gly Ser Val Leu Val Leu Gly Ala Ile Ile Ser | |
| 65 70 75 80 | |
| gac tgg gtg gac aag aat gct aga ctt aaa gtg gcc cag acc tcg ctg | 288 |
| Asp Trp Val Asp Lys Asn Ala Arg Leu Lys Val Ala Gln Thr Ser Leu | |
| 85 90 95 | |
| gtg gta cag aat gtt tca gtc atc ctg tgt gga atc atc ctg atg atg | 336 |
| Val Val Gln Asn Val Ser Val Ile Leu Cys Gly Ile Ile Leu Met Met | |
| 100 105 110 | |
| gtt ttc tta cat aaa cat gag ctt ctg acc atg tac cat gga tgg gtt | 384 |
| Val Phe Leu His Lys His Glu Leu Leu Thr Met Tyr His Gly Trp Val | |
| 115 120 125 | |
| ctc act tcc tgc tat atc ctg atc atc act att gca aat att gca aat | 432 |
| Leu Thr Ser Cys Tyr Ile Leu Ile Ile Thr Ile Ala Asn Ile Ala Asn | |
| 130 135 140 | |
| ttg gcc agt act gct act gca atc aca atc caa agg gat tgg att gtt | 480 |
| Leu Ala Ser Thr Ala Thr Ala Ile Thr Ile Gln Arg Asp Trp Ile Val | |
| 145 150 155 160 | |
| gtt gtt gca gga gaa gac aga agc aaa cta gca aat atg aat gcc aca | 528 |
| Val Val Ala Gly Glu Asp Arg Ser Lys Leu Ala Asn Met Asn Ala Thr | |
| 165 170 175 | |
| ata cga agg att gac cag tta acc aac atc tta gcc ccc atg gct gtt | 576 |
| Ile Arg Arg Ile Asp Gln Leu Thr Asn Ile Leu Ala Pro Met Ala Val | |
| 180 185 190 | |
| ggc cag att atg aca ttt ggc tcc cca gtc atc ggc tgt ggc ttt att | 624 |
| Gly Gln Ile Met Thr Phe Gly Ser Pro Val Ile Gly Cys Gly Phe Ile | |
| 195 200 205 | |
| tcg gga tgg aac ttg gta tcc atg tgc gtg gag tac gtc ctg ctc tgg | 672 |
| Ser Gly Trp Asn Leu Val Ser Met Cys Val Glu Tyr Val Leu Leu Trp | |
| 210 215 220 | |
| aag gtt tac cag aaa acc cca gct cta gct gtg aaa gct ggt ctt aaa | 720 |

1. The first step in the process is to identify the problem or issue that needs to be addressed. This involves gathering information and understanding the context of the problem.



Ser Val Pro Ile Ile Ser Val Ser Leu Leu Phe Ala Gly Val Ile Ala
 450 455 460

gct aga atc ggt ctt tgg tcc ttt gat tta act gtg aca cag ttg ctg 1440
 Ala Arg Ile Gly Leu Trp Ser Phe Asp Leu Thr Val Thr Gln Leu Leu
 465 470 475 480

caa gaa aat gta att gaa tct gaa aga ggc att ata aat ggt gta cag 1488
 Gln Glu Asn Val Ile Glu Ser Glu Arg Gly Ile Ile Asn Gly Val Gln
 485 490 495

aac tcc atg aac tat ctt ctt gat ctt ctg cat ttc atc atg gtc atc 1536
 Asn Ser Met Asn Tyr Leu Leu Asp Leu Leu His Phe Ile Met Val Ile
 500 505 510

ctg gct cca aat cct gaa gct ttt ggc ttg ctc gta ttg att tca gtc 1584
 Leu Ala Pro Asn Pro Glu Ala Phe Gly Leu Leu Val Leu Ile Ser Val
 515 520 525

tcc ttt gtg gca atg ggc cac att atg tat ttc cga ttt gcc caa aat 1632
 Ser Phe Val Ala Met Gly His Ile Met Tyr Phe Arg Phe Ala Gln Asn
 530 535 540

act ctg gga aac aag ctc ttt gct tgc ggt cct gat gca aaa gaa gtt 1680
 Thr Leu Gly Asn Lys Leu Phe Ala Cys Gly Pro Asp Ala Lys Glu Val
 545 550 555 560

agg aag gaa aat caa gca aat aca tct gtt gtt tga 1716
 Arg Lys Glu Asn Gln Ala Asn Thr Ser Val Val
 565 570

<210> 4
 <211> 571
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

Met Thr Arg Ala Gly Asp His Asn Arg Gln Arg Gly Cys Cys Gly Ser
 1 5 10 15

Leu Ala Asp Tyr Leu Thr Ser Ala Lys Phe Leu Leu Tyr Leu Gly His
 20 25 30

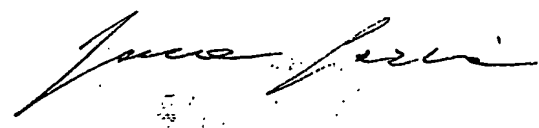
Ser Leu Ser Thr Trp Gly Asp Arg Met Trp His Phe Ala Val Ser Val
 35 40 45

Phe Leu Val Glu Leu Tyr Gly Asn Ser Leu Leu Leu Thr Ala Val Tyr
 50 55 60

Gly Leu Val Val Ala Gly Ser Val Leu Val Leu Gly Ala Ile Ile Ser

80

Ala Glu Pro Phe Arg Thr Phe Arg Asp Gly Trp Val Ser Tyr Tyr Asn



290

295

300

Gln Pro Val Phe Leu Ala Gly Met Gly Leu Ala Phe Leu Tyr Met Thr
 305 310 315 320

Val Leu Gly Phe Asp Cys Ile Thr Thr Gly Tyr Ala Tyr Thr Gln Gly
 325 330 335

Leu Ser Gly Ser Ile Leu Ser Ile Leu Met Gly Ala Ser Ala Ile Thr
 340 345 350

Gly Ile Met Gly Thr Val Ala Phe Thr Trp Leu Arg Arg Lys Cys Gly
 355 360 365

Leu Val Arg Thr Gly Leu Ile Ser Gly Leu Ala Gln Leu Ser Cys Leu
 370 375 380

Ile Leu Cys Val Ile Ser Val Phe Met Pro Gly Ser Pro Leu Asp Leu
 385 390 395 400

Ser Val Ser Pro Phe Glu Asp Ile Arg Ser Arg Phe Ile Gln Gly Glu
 405 410 415

Ser Ile Thr Pro Thr Lys Ile Pro Glu Ile Thr Thr Glu Ile Tyr Met
 420 425 430

Ser Asn Gly Ser Asn Ser Ala Asn Ile Val Pro Glu Thr Ser Pro Glu
 435 440 445

Ser Val Pro Ile Ile Ser Val Ser Leu Leu Phe Ala Gly Val Ile Ala
 450 455 460

Ala Arg Ile Gly Leu Trp Ser Phe Asp Leu Thr Val Thr Gln Leu Leu
 465 470 475 480

Gln Glu Asn Val Ile Glu Ser Glu Arg Gly Ile Ile Asn Gly Val Gln
 485 490 495

Asn Ser Met Asn Tyr Leu Leu Asp Leu Leu His Phe Ile Met Val Ile
 500 505 510

Leu Ala Pro Asn Pro Glu Ala Phe Gly Leu Leu Val Leu Ile Ser Val

James Serra

515

520

525

Ser Phe Val Ala Met Gly His Ile Met Tyr Phe Arg Phe Ala Gln Asn
530 535 540

Thr Leu Gly Asn Lys Leu Phe Ala Cys Gly Pro Asp Ala Lys Glu Val
545 550 555 560

Arg Lys Glu Asn Gln Ala Asn Thr Ser Val Val
565 570

<210> 5
<211> 1716
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1716)
<223> cDNA codificante per una ferroportina mutata in posizione 174 (N174)

<400> 5
atg acc agg gcg gga gat cac aac cgc cag aga gga tgc tgt gga tcc 48
Met Thr Arg Ala Gly Asp His Asn Arg Gln Arg Gly Cys Cys Gly Ser
1 5 10 15
ttg gcc gac tac ctg acc tct gca aaa ttc ctt ctc tac ctt ggt cat 96
Leu Ala Asp Tyr Leu Thr Ser Ala Lys Phe Leu Leu Tyr Leu Gly His
20 25 30
tct ctc tct act tgg gga gat cgg atg tgg cac ttt gcg gtg tct gtg 144
Ser Leu Ser Thr Trp Gly Asp Arg Met Trp His Phe Ala Val Ser Val
35 40 45
ttt ctg gta gag ctc tat gga aac agc ctc ctt ttg aca gca gtc tac 192
Phe Leu Val Glu Leu Tyr Gly Asn Ser Leu Leu Leu Thr Ala Val Tyr
50 55 60
ggg ctg gtg gtg gca ggg tct gtt ctg gtc ctg gga gcc atc atc ggt 240
Gly Leu Val Val Ala Gly Ser Val Leu Val Leu Gly Ala Ile Ile Gly
65 70 75 80
gac tgg gtg gac aag aat gct aga ctt aaa gtg gcc cag acc tcg ctg 288
Asp Trp Val Asp Lys Asn Ala Arg Leu Lys Val Ala Gln Thr Ser Leu
85 90 95
gtg gta cag aat gtt tca gtc atc ctg tgt gga atc atc ctg atg atg 336
Val Val Gln Asn Val Ser Val Ile Leu Cys Gly Ile Ile Leu Met Met
100 105 110

gtt ttc tta cat aaa cat gag ctt ctg acc atg tac cat gga tgg gtt 384
 Val Phe Leu His Lys His Glu Leu Leu Thr Met Tyr His Gly Trp Val
 115 120 125

ctc act tcc tgc tat atc ctg atc atc act att gca aat att gca aat 432
 Leu Thr Ser Cys Tyr Ile Leu Ile Ile Thr Ile Ala Asn Ile Ala Asn
 130 135 140

ttg gcc agt act gct act gca atc aca atc caa agg gat tgg att gtt 480
 Leu Ala Ser Thr Ala Thr Ala Ile Thr Ile Gln Arg Asp Trp Ile Val
 145 150 155 160

gtt gtt gca gga gaa gac aga agc aaa cta gca aat atg att gcc aca 528
 Val Val Ala Gly Glu Asp Arg Ser Lys Leu Ala Asn Met Ile Ala Thr
 165 170 175

ata cga agg att gac cag tta acc aac atc tta gcc ccc atg gct gtt 576
 Ile Arg Arg Ile Asp Gln Leu Thr Asn Ile Leu Ala Pro Met Ala Val
 180 185 190

ggc cag att atg aca ttt ggc tcc cca gtc atc ggc tgt ggc ttt att 624
 Gly Gln Ile Met Thr Phe Gly Ser Pro Val Ile Gly Cys Gly Phe Ile
 195 200 205

tcg gga tgg aac ttg gta tcc atg tgc gtg gag tac gtc ctg ctc tgg 672
 Ser Gly Trp Asn Leu Val Ser Met Cys Val Glu Tyr Val Leu Leu Trp
 210 215 220

aag gtt tac cag aaa acc cca gct cta gct gtg aaa gct ggt ctt aaa 720
 Lys Val Tyr Gln Lys Thr Pro Ala Leu Ala Val Lys Ala Gly Leu Lys
 225 230 235 240

gaa gag gaa act gaa ttg aaa cag ctg aat tta cac aaa gat act gag 768
 Glu Glu Glu Thr Glu Leu Lys Gln Leu Asn Leu His Lys Asp Thr Glu
 245 250 255

cca aaa ccc ctg gag gga act cat cta atg ggt gtg aaa gac tct aac 816
 Pro Lys Pro Leu Glu Gly Thr His Leu Met Gly Val Lys Asp Ser Asn
 260 265 270

atc cat gag ctt gaa cat gag caa gag cct act tgt gcc tcc cag atg 864
 Ile His Glu Leu Glu His Glu Gln Glu Pro Thr Cys Ala Ser Gln Met
 275 280 285

gct gag ccc ttc cgt acc ttc cga gat gga tgg gtc tcc tac tac aac 912
 Ala Glu Pro Phe Arg Thr Phe Arg Asp Gly Trp Val Ser Tyr Tyr Asn
 290 295 300

cag cct gtg ttt ctg gct ggc atg ggt ctt gct ttc ctt tat atg act 960
 Gln Pro Val Phe Leu Ala Gly Met Gly Leu Ala Phe Leu Tyr Met Thr
 305 310 315 320

gtc ctg ggc ttt gac tgc atc acc aca ggg tac gcc tac act cag gga 1008
 Val Leu Gly Phe Asp Cys Ile Thr Thr Gly Tyr Ala Tyr Thr Gln Gly
 325 330 335

James Lee



| | |
|---|------|
| ctg agt ggt tcc atc ctc agt att ttg atg gga gca tca gct ata act Leu Ser Gly Ser Ile Leu Ser Ile Leu Met Gly Ala Ser Ala Ile Thr 340 345 350 | 1055 |
| gga ata atg gga act gta gct ttt act tgg cta cgt cga aaa tgt ggt Gly Ile Met Gly Thr Val Ala Phe Thr Trp Leu Arg Arg Lys Cys Gly 355 360 365 | 1105 |
| ttg gtt cgg aca ggt ctg atc tca gga ttg gca cag ctt tcc tgt ttg Leu Val Arg Thr Gly Leu Ile Ser Gly Leu Ala Gln Leu Ser Cys Leu 370 375 380 | 1152 |
| atc ttg tgt gtg atc tct gta ttc atg cct gga agc ccc ctg gac ttg Ile Leu Cys Val Ile Ser Val Phe Met Pro Gly Ser Pro Leu Asp Leu 385 390 395 400 | 1200 |
| tcc gtt tct cct ttt gaa gat atc cga tca agg ttc att caa gga gag Ser Val Ser Pro Phe Glu Asp Ile Arg Ser Arg Phe Ile Gln Gly Glu 405 410 415 | 1248 |
| tca att aca cct acc aag ata cct gaa att aca act gaa ata tac atg Ser Ile Thr Pro Thr Lys Ile Pro Glu Ile Thr Thr Glu Ile Tyr Met 420 425 430 | 1296 |
| tct aat ggg tct aat tct gct aat att gtc ccg gag aca agt cct gaa Ser Asn Gly Ser Asn Ser Ala Asn Ile Val Pro Glu Thr Ser Pro Glu 435 440 445 | 1344 |
| tct gtg ccc ata atc tct gtc agt ctg ctg ttt gca ggc gtc att gct Ser Val Pro Ile Ile Ser Val Ser Leu Leu Phe Ala Gly Val Ile Ala 450 455 460 | 1392 |
| gct aga atc ggt ctt tgg tcc ttt gat tta act gtg aca cag ttg ctg Ala Arg Ile Gly Leu Trp Ser Phe Asp Leu Thr Val Thr Gln Leu Leu 465 470 475 480 | 1440 |
| caa gaa aat gta att gaa tct gaa aga ggc att ata aat ggt gta cag Gln Glu Asn Val Ile Glu Ser Glu Arg Gly Ile Ile Asn Gly Val Gln 485 490 495 | 1488 |
| aac tcc atg aac tat ctt ctt gat ctt ctg cat ttc atc atg gtc atc Asn Ser Met Asn Tyr Leu Leu Asp Leu Leu His Phe Ile Met Val Ile 500 505 510 | 1536 |
| ctg gct cca aat cct gaa gct ttt ggc ttg ctc gta ttg att tca gtc Leu Ala Pro Asn Pro Glu Ala Phe Gly Leu Leu Val Leu Ile Ser Val 515 520 525 | 1584 |
| tcc ttt gtg gca atg ggc cac att atg tat ttc cga ttt gcc caa aat Ser Phe Val Ala Met Gly His Ile Met Tyr Phe Arg Phe Ala Gln Asn 530 535 540 | 1632 |
| act ctg gga aac aag ctc ttt gct tgc ggt cct gat gca aaa gaa gtt Thr Leu Gly Asn Lys Leu Phe Ala Cys Gly Pro Asp Ala Lys Glu Val 545 550 555 560 | 1680 |

Ile Arg Arg Ile Asp Gln Leu Thr Asn Ile Leu Ala Pro Met Ala Val
 180 185 190

Gly Gln Ile Met Thr Phe Gly Ser Pro Val Ile Gly Cys Gly Phe Ile
 195 200 205

Ser Gly Trp Asn Leu Val Ser Met Cys Val Glu Tyr Val Leu Leu Trp
 210 215 220

Lys Val Tyr Gln Lys Thr Pro Ala Leu Ala Val Lys Ala Gly Leu Lys
 225 230 235 240

Glu Glu Glu Thr Glu Leu Lys Gln Leu Asn Leu His Lys Asp Thr Glu
 245 250 255

Pro Lys Pro Leu Glu Gly Thr His Leu Met Gly Val Lys Asp Ser Asn
 260 265 270

Ile His Glu Leu Glu His Glu Gln Glu Pro Thr Cys Ala Ser Gln Met
 275 280 285

Ala Glu Pro Phe Arg Thr Phe Arg Asp Gly Trp Val Ser Tyr Tyr Asn
 290 295 300

Gln Pro Val Phe Leu Ala Gly Met Gly Leu Ala Phe Leu Tyr Met Thr
 305 310 315 320

Val Leu Gly Phe Asp Cys Ile Thr Thr Gly Tyr Ala Tyr Thr Gln Gly
 325 330 335

Leu Ser Gly Ser Ile Leu Ser Ile Leu Met Gly Ala Ser Ala Ile Thr
 340 345 350

Gly Ile Met Gly Thr Val Ala Phe Thr Trp Leu Arg Arg Lys Cys Gly
 355 360 365

Leu Val Arg Thr Gly Leu Ile Ser Gly Leu Ala Gln Leu Ser Cys Leu
 370 375 380

Ile Leu Cys Val Ile Ser Val Phe Met Pro Gly Ser Pro Leu Asp Leu
 385 390 395 400

Ser Val Ser Pro Phe Glu Asp Ile Arg Ser Arg Phe Ile Gln Gly Glu
 405 410 415

Ser Ile Thr Pro Thr Lys Ile Pro Glu Ile Thr Thr Glu Ile Tyr Met
 420 425 430

Ser Asn Gly Ser Asn Ser Ala Asn Ile Val Pro Glu Thr Ser Pro Glu
 435 440 445

Ser Val Pro Ile Ile Ser Val Ser Leu Leu Phe Ala Gly Val Ile Ala
 450 455 460

Ala Arg Ile Gly Leu Trp Ser Phe Asp Leu Thr Val Thr Gln Leu Leu
 465 470 475 480

Gln Glu Asn Val Ile Glu Ser Glu Arg Gly Ile Ile Asn Gly Val Gln
 485 490 495

Asn Ser Met Asn Tyr Leu Leu Asp Leu Leu His Phe Ile Met Val Ile
 500 505 510

Leu Ala Pro Asn Pro Glu Ala Phe Gly Leu Leu Val Leu Ile Ser Val
 515 520 525

Ser Phe Val Ala Met Gly His Ile Met Tyr Phe Arg Phe Ala Gln Asn
 530 535 540

Thr Leu Gly Asn Lys Leu Phe Ala Cys Gly Pro Asp Ala Lys Glu Val
 545 550 555 560

Arg Lys Glu Asn Gln Ala Asn Thr Ser Val Val
 565 570

- <210> 7
- <211> 1716
- <212> DNA
- <213> Homo. sapiens
- <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(1716)
- <223> cDNA codificante per una ferroportina 1 mutata in posizione 248 (Q248).

<400> 7

atg acc agg gcg gga gat cac aac cgc cag aga gga tgc tgt gga tcc
 Met Thr Arg Ala Gly Asp His Asn Arg Gln Arg Gly Cys Cys Gly Ser
 1 5 10 15

ttg gcc gac tac ctg acc tct gca aaa ttc ctt ctc tac ctt ggt cat
 Leu Ala Asp Tyr Leu Thr Ser Ala Lys Phe Leu Leu Tyr Leu Gly His
 20 25 30

tct ctc tct act tgg gga gat cgg atg tgg cac ttt gcg gtg tct gtg
 Ser Leu Ser Thr Trp Gly Asp Arg Met Trp His Phe Ala Val Ser Val
 35 40 45

ttt ctg gta gag ctc tat gga aac agc ctc ctt ttg aca gca gtc tac
 Phe Leu Val Glu Leu Tyr Gly Asn Ser Leu Leu Leu Thr Ala Val Tyr
 50 55 60

ggg ctg gtg gtg gca ggg tct gtt ctg gtc ctg gga gcc atc atc ggt
 Gly Leu Val Val Ala Gly Ser Val Leu Val Leu Gly Ala Ile Ile Gly
 65 70 75 80

gac tgg gtg gac aag aat gct aga ctt aaa gtg gcc cag acc tcg ctg
 Asp Trp Val Asp Lys Asn Ala Arg Leu Lys Val Ala Gln Thr Ser Leu
 85 90 95

gtg gta cag aat gtt tca gtc atc ctg tgt gga atc atc ctg atg atg
 Val Val Gln Asn Val Ser Val Ile Leu Cys Gly Ile Ile Leu Met Met
 100 105 110

gtt ttc tta cat aaa cat gag ctt ctg acc atg tac cat gga tgg gtt
 Val Phe Leu His Lys His Glu Leu Leu Thr Met Tyr His Gly Trp Val
 115 120 125

ctc act tcc tgc tat atc ctg atc atc act att gca aat att gca aat
 Leu Thr Ser Cys Tyr Ile Leu Ile Ile Thr Ile Ala Asn Ile Ala Asn
 130 135 140

ttg gcc agt act gct act gca atc aca atc caa agg gat tgg att gtt
 Leu Ala Ser Thr Ala Thr Ala Ile Thr Ile Gln Arg Asp Trp Ile Val
 145 150 155 160

gtt gtt gca gga gaa gac aga agc aaa cta gca aat atg aat gcc aca
 Val Val Ala Gly Glu Asp Arg Ser Lys Leu Ala Asn Met Asn Ala Thr
 165 170 175

ata cga agg att gac cag tta acc aac atc tta gcc ccc atg gct gtt
 Ile Arg Arg Ile Asp Gln Leu Thr Asn Ile Leu Ala Pro Met Ala Val
 180 185 190

ggc cag att atg aca ttt ggc tcc cca gtc atc ggc tgt ggc ttt att
 Gly Gln Ile Met Thr Phe Gly Ser Pro Val Ile Gly Cys Gly Phe Ile
 195 200 205

tcg gga tgg aac ttg gta tcc atg tgc gtg gag tac gtc ctg ctc tgg
 Ser Gly Trp Asn Leu Val Ser Met Cys Val Glu Tyr Val Leu Leu Trp
 210 215 220



96

144

192

240

288

336

384

432

480

528

576

624

672

aag gtt tac cag aaa acc cca gct cta gct gtg aaa gct ggt ctt aaa 720
 Lys Val Tyr Gln Lys Thr Pro Ala Leu Ala Val Lys Ala Gly Leu Lys
 225 230 235 240

gaa gag gaa act gaa ttg aaa cat ctg aat tta cac aaa gat act gag 768
 Glu Glu Glu Thr Glu Leu Lys His Leu Asn Leu His Lys Asp Thr Glu
 245 250 255

cca aaa ccc ctg gag gga act cat cta atg ggt gtg aaa gac tct aac 816
 Pro Lys Pro Leu Glu Gly Thr His Leu Met Gly Val Lys Asp Ser Asn
 260 265 270

atc cat gag ctt gaa cat gag caa gag cct act tgt gcc tcc cag atg 864
 Ile His Glu Leu Glu His Glu Gln Glu Pro Thr Cys Ala Ser Gln Met
 275 280 285

gct gag ccc ttc cgt acc ttc cga gat gga tgg gtc tcc tac tac aac 912
 Ala Glu Pro Phe Arg Thr Phe Arg Asp Gly Trp Val Ser Tyr Tyr Asn
 290 295 300

cag cct gtg ttt ctg gct ggc atg ggt ctt gct ttc ctt tat atg act 960
 Gln Pro Val Phe Leu Ala Gly Met Gly Leu Ala Phe Leu Tyr Met Thr
 305 310 315 320

gtc ctg ggc ttt gac tgc atc acc aca ggg tac gcc tac act cag gga 1008
 Val Leu Gly Phe Asp Cys Ile Thr Thr Gly Tyr Ala Tyr Thr Gln Gly
 325 330 335

ctg agt ggt tcc atc ctc agt att ttg atg gga gca tca gct ata act 1056
 Leu Ser Gly Ser Ile Leu Ser Ile Leu Met Gly Ala Ser Ala Ile Thr
 340 345 350

gga ata atg gga act gta gct ttt act tgg cta cgt cga aaa tgt ggt 1104
 Gly Ile Met Gly Thr Val Ala Phe Thr Trp Leu Arg Arg Lys Cys Gly
 355 360 365

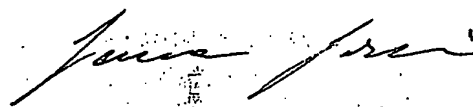
ttg gtt cgg aca ggt ctg atc tca gga ttg gca cag ctt tcc tgt ttg 1152
 Leu Val Arg Thr Gly Leu Ile Ser Gly Leu Ala Gln Leu Ser Cys Leu
 370 375 380

atc ttg tgt gtg atc tct gta ttc atg cct gga agc ccc ctg gac ttg 1200
 Ile Leu Cys Val Ile Ser Val Phe Met Pro Gly Ser Pro Leu Asp Leu
 385 390 395 400

tcc gtt tct cct ttt gaa gat atc cga tca agg ttc att caa gga gag 1248
 Ser Val Ser Pro Phe Glu Asp Ile Arg Ser Arg Phe Ile Gln Gly Glu
 405 410 415

tca att aca cct acc aag ata cct gaa att aca act gaa ata tac atg 1296
 Ser Ile Thr Pro Thr Lys Ile Pro Glu Ile Thr Thr Glu Ile Tyr Met
 420 425 430

tct aat ggg tct aat tct gct aat att gtc ccg gag aca agt cct gaa 1344
 Ser Asn Gly Ser Asn Ser Ala Asn Ile Val Pro Glu Thr Ser Pro Glu
 435 440 445



tct gtg ccc ata atc tct gtc agt ctg ctg ttt gca ggc gtc att gct 1392
 Ser Val Pro Ile Ile Ser Val Ser Leu Leu Phe Ala Gly Val Ile Ala
 450 455 460

gct aga atc ggt ctt tgg tcc ttt gat tta act gtg aca cag ttg ctg 1440
 Ala Arg Ile Gly Leu Trp Ser Phe Asp Leu Thr Val Thr Gln Leu Leu
 465 470 475 480

caa gaa aat gta att gaa tct gaa aga ggc att ata aat ggt gta cag 1488
 Gln Glu Asn Val Ile Glu Ser Glu Arg Gly Ile Ile Asn Gly Val Gln
 485 490 495

aac tcc atg aac tat ctt ctt gat ctt ctg cat ttc atc atg gtc atc 1536
 Asn Ser Met Asn Tyr Leu Leu Asp Leu Leu His Phe Ile Met Val Ile
 500 505 510

ctg gct cca aat cct gaa gct ttt ggc ttg ctc gta ttg att tca gtc 1584
 Leu Ala Pro Asn Pro Glu Ala Phe Gly Leu Leu Val Leu Ile Ser Val
 515 520 525

tcc ttt gtg gca atg ggc cac att atg tat ttc cga ttt gcc caa aat 1632
 Ser Phe Val Ala Met Gly His Ile Met Tyr Phe Arg Phe Ala Gln Asn
 530 535 540

act ctg gga aac aag ctc ttt gct tgc ggt cct gat gca aaa gaa gtt 1680
 Thr Leu Gly Asn Lys Leu Phe Ala Cys Gly Pro Asp Ala Lys Glu Val
 545 550 555 560

agg aag gaa aat caa gca aat aca tct gtt gtt tga 1716
 Arg Lys Glu Asn Gln Ala Asn Thr Ser Val Val
 565 570

<210> 8
 <211> 571
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8

Met Thr Arg Ala Gly Asp His Asn Arg Gln Arg Gly Cys Cys Gly Ser
 1 5 10 15

Leu Ala Asp Tyr Leu Thr Ser Ala Lys Phe Leu Leu Tyr Leu Gly His
 20 25 30

Ser Leu Ser Thr Trp Gly Asp Arg Met Trp His Phe Ala Val Ser Val
 35 40 45

Phe Leu Val Glu Leu Tyr Gly Asn Ser Leu Leu Leu Thr Ala Val Tyr
 50 55 60

June June

Gly Leu Val Val Ala Gly Ser Val Leu Val Leu Gly Ala Ile Ile Gly
65 70 75 80

Asp Trp Val Asp Lys Asn Ala Arg Leu Lys Val Ala Gln Thr Ser Leu
 85 90 95

Val Val Gln Asn Val Ser Val Ile Leu Cys Gly Ile Ile Leu Met Met
 100 105 110

Val Phe Leu His Lys His Glu Leu Leu Thr Met Tyr His Gly Trp Val
 115 120 125

Leu Thr Ser Cys Tyr Ile Leu Ile Ile Thr Ile Ala Asn Ile Ala Asn
 130 135 140

Leu Ala Ser Thr Ala Thr Ala Ile Thr Ile Gln Arg Asp Trp Ile Val
145 150 155 160

Val Val Ala Gly Glu Asp Arg Ser Lys Leu Ala Asn Met Asn Ala Thr
 165 170 175

Ile Arg Arg Ile Asp Gln Leu Thr Asn Ile Leu Ala Pro Met Ala Val
 180 185 190

Gly Gln Ile Met Thr Phe Gly Ser Pro Val Ile Gly Cys Gly Phe Ile
 195 200 205

Ser Gly Trp Asn Leu Val Ser Met Cys Val Glu Tyr Val Leu Leu Trp
 210 215 220

Lys Val Tyr Gln Lys Thr Pro Ala Leu Ala Val Lys Ala Gly Leu Lys
225 230 235 240

Glu Glu Glu Thr Glu Leu Lys His Leu Asn Leu His Lys Asp Thr Glu
 245 250 255

Pro Lys Pro Leu Glu Gly Thr His Leu Met Gly Val Lys Asp Ser Asn
 260 265 270

Ile His Glu Leu Glu His Glu Gln Glu Pro Thr Cys Ala Ser Gln Met
 275 280 285

James J. ...

Ala Glu Pro Phe Arg Thr Phe Arg Asp Gly Trp Val Ser Tyr Tyr Asn
 290 295 300

Gln Pro Val Phe Leu Ala Gly Met Gly Leu Ala Phe Leu Tyr Met Thr
 305 310 315 320

Val Leu Gly Phe Asp Cys Ile Thr Thr Gly Tyr Ala Tyr Thr Gln Gly
 325 330 335

Leu Ser Gly Ser Ile Leu Ser Ile Leu Met Gly Ala Ser Ala Ile Thr
 340 345 350

Gly Ile Met Gly Thr Val Ala Phe Thr Trp Leu Arg Arg Lys Cys Gly
 355 360 365

Leu Val Arg Thr Gly Leu Ile Ser Gly Leu Ala Gln Leu Ser Cys Leu
 370 375 380

Ile Leu Cys Val Ile Ser Val Phe Met Pro Gly Ser Pro Leu Asp Leu
 385 390 395 400

Ser Val Ser Pro Phe Glu Asp Ile Arg Ser Arg Phe Ile Gln Gly Glu
 405 410 415

Ser Ile Thr Pro Thr Lys Ile Pro Glu Ile Thr Thr Glu Ile Tyr Met
 420 425 430

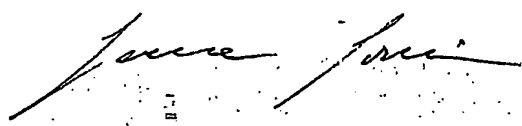
Ser Asn Gly Ser Asn Ser Ala Asn Ile Val Pro Glu Thr Ser Pro Glu
 435 440 445

Ser Val Pro Ile Ile Ser Val Ser Leu Leu Phe Ala Gly Val Ile Ala
 450 455 460

Ala Arg Ile Gly Leu Trp Ser Phe Asp Leu Thr Val Thr Gln Leu Leu
 465 470 475 480

Gln Glu Asn Val Ile Glu Ser Glu Arg Gly Ile Ile Asn Gly Val Gln
 485 490 495

Asn Ser Met Asn Tyr Leu Leu Asp Leu Leu His Phe Ile Met Val Ile
 500 505 510



Leu Ala Pro Asn Pro Glu Ala Phe Gly Leu Leu Val Leu Ile Ser Val
 515 520 525

Ser Phe Val Ala Met Gly His Ile Met Tyr Phe Arg Phe Ala Gln Asn
 530 535 540

Thr Leu Gly Asn Lys Leu Phe Ala Cys Gly Pro Asp Ala Lys Glu Val
 545 550 555 560

Arg Lys Glu Asn Gln Ala Asn Thr Ser Val Val
 565 570

<210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> polymerase chain reaction primer
 <222> (1)..(20)
 <223> PCR primer. Esone 1 5'

<400> 9
 ggtgctatct ccagttcctt

20

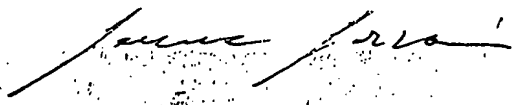
<210> 10
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> PCR primer. Esone 1 3'

<400> 10
 gttcacagca gagccacatt

20

<210> 11
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> PCR primer esone 2 5'



<400> 11
cagctcatta agtgactacc atcgc

25

<210> 12
<211> 24
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 12
ggcttaatac aactggctag aacg

24

<210> 13
<211> 23
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> PCR primer. Esone 3 5'

<400> 13
cataatgtag ccaggaagtg ccc

23

<210> 14
<211> 22
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> PCR primer. Esone 3 3'

<400> 14
tccagaggtg gtgccatcta ag

22

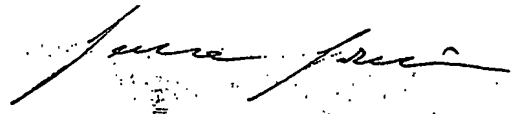
<210> 15
<211> 24
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 15
gagacatttt gatgtaatgt acac

24

<210> 16
<211> 24
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 16



ctaccagata ttcaattttc tgcc

24

<210> 17
<211> 24
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 17
ccaccaaaga ctatttttaaa ctgc

24

<210> 18
<211> 24
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 18
tcaccaccga tttaaagtga atcc

24

<210> 19
<211> 23
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> PCR primer. Esone 6 5'.

<400> 19
gtattgtgta aatgggcagt etc

23

<210> 20
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> PCR primer. Esone 6 3'

<400> 20
ccccactggt aataaaacct g

21

<210> 21
<211> 24
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 21
ggctttttatt tctacatgtc ctcc

24

pure for

<210> 22
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 22
 acatttaggg aacatttcag atc

23

<210> 23
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 23
 aaggtgactt aaagacagtc aggc

24

<210> 24
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 24
 gctgacttag gtttcctaaa cagc

24

<210> 25
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> oligonucleotide comprendente il polimorfismo al nt 238

<400> 25
 atcagtgact

10

<210> 26
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> oligonucleotide comprendente il polimorfismo al nt 521.

<400> 26
 gatgattgcc

10

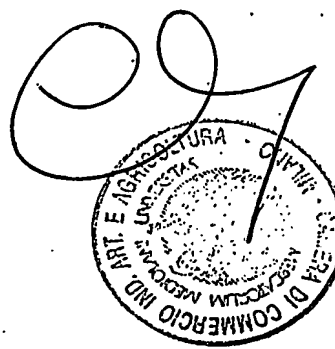
James J. Smith

<210> 27
<211> 10
<212> DNA
<213> Homo sapiens

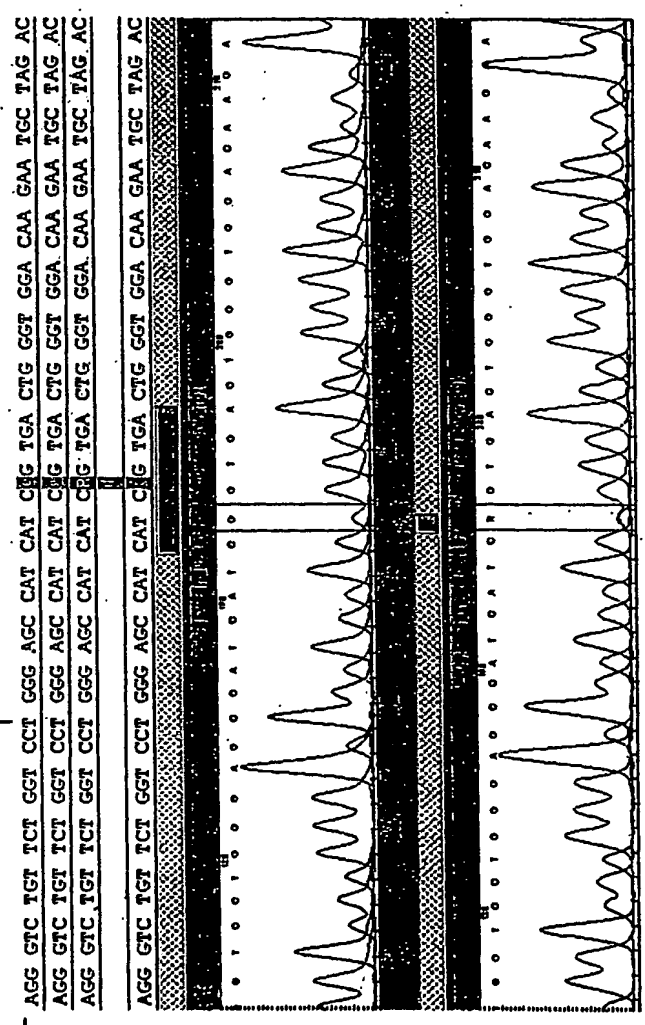
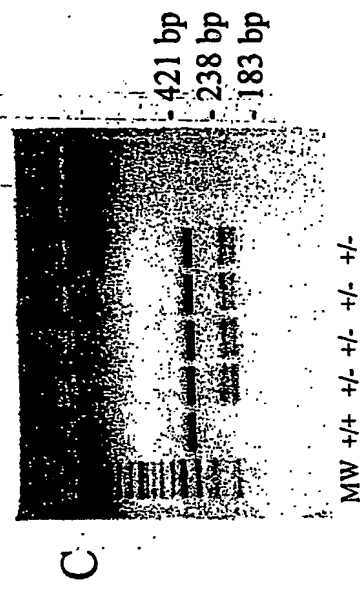
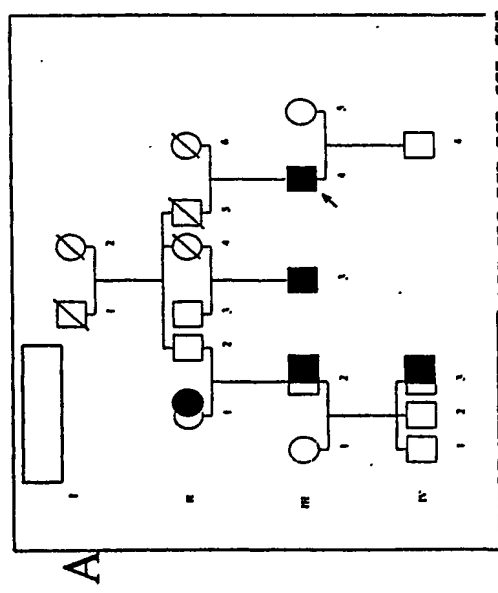
<220>
<221> misc_feature
<223> oligonucleotide comprendente il polimorfismo al nt 744

<400> 27
gaaacatctg

10



per favore per favore



Controllo

Malato

M 2003 A 0 0 1 1 5 6



Yours friend

TTT TTA AAG AAG AGG AAA CTG AAT TGA AAC **AAC** TGA ATT TAC ACA AAG GTA AAC TGA ACA CAA
 TTT TTA AAG AAG AGG AAA CTG AAT TGA AAC **AAC** TGA ATT TAC ACA AAG GTA AAC TGA ACA CAA
 TTT TTA AAG AAG AGG AAA CTG AAT TGA AAC **AAC** TGA ATT TAC ACA AAG GTA AAC TGA ACA CAA

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1 | C | TTA | AAG | AAG | AGG | AAA | CTG | ANT | TGA | AAC | A | C | TGA | ATT | TAC | ACA | AAG | GTA | AAC | TGA | ACA | CAA |
|---|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|

97

— 425 bp
— 302 bp
— 123 bp

MW +/- +/- +/- +/- +/- +/- +/- +/- +/- +/-

MI 2003A 001156



4453

+/+ +/+ +/+ +/+ +/+ +/+ +/+

A->T esone 6

Cambio AA 174

Asparagina → *Isoleucina*

| | |
|------------|------------|
| Idrofílico | Idrofóbico |
| Non carico | Non carico |
| PM: 132 | PM: 131 |

Controllo

Malato

MI 2003 A 0 0 1 1 5 6

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.